

SÀNG LỌC CHỦNG *Bacillus* spp. CÓ TÍNH ĐỐI KHÁNG *Streptococcus agalactiae* GÂY BỆNH PHÙ MẮT, XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ RÔ PHI (*Oreochromis* sp.)

Lê Văn Hậu^{1*}, Phạm Thị Hoa Mai², Lê Lưu Phương Hạnh¹,

Ngô Huỳnh Phương Thảo¹

¹Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh;

²Đại học Nguyễn Tất Thành.

*Tác giả liên hệ: levanhauts@gmail.com

Nhận bài: 20/05/2021 Hoàn thành phản biện: 26/09/2021 Chấp nhận bài: 08/10/2021

TÓM TẮT

Trong số các bệnh thường gặp trên cá rô phi, bệnh phù mắt xuất huyết do nhóm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây ra là phổ biến nhất, với tỷ lệ chết cao ở giai đoạn nuôi thương phẩm vào thời điểm nắng nóng của mùa hè, gây thiệt hại kinh tế nghiêm trọng. Gần đây, việc sử dụng vi khuẩn đối kháng với tác nhân gây bệnh ngày càng được quan tâm. Vì thế, nghiên cứu này triển khai sàng lọc chủng *Bacillus* spp. có khả năng đối kháng *S. agalactiae* bằng phương pháp giếng khuếch tán. Tổng cộng 32 chủng *S. agalactiae* được phân lập từ mẫu bệnh cá rô phi nuôi tại tỉnh An Giang, Vĩnh Long và TP. Hồ Chí Minh. Các chủng này được xác định hình thái, sinh hóa và PCR. Bộ chủng *Bacillus* spp. (n = 60) của Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh được sử dụng để kiểm tra hoạt tính đối kháng với 12 chủng *S. agalactiae* đại diện cho ba vùng địa lý. Kết quả, 18 chủng *Bacillus* spp. có hoạt tính đối kháng *in vitro* mạnh với các chủng *S. agalactiae* (D > 18 mm). Đồng thời, việc phân lập *S. agalactiae* cho thấy sự hiện diện rất phổ biến chủng vi khuẩn này ở cả ba vùng địa lý khảo sát. Do đó, việc kiểm soát bệnh do *S. agalactiae* gây ra trên cá rô phi bằng vi khuẩn đối kháng là rất cần thiết.

Từ khóa: *Bacillus* spp., Đối kháng, Phù mắt xuất huyết, Rô phi, *Streptococcus agalactiae*

SCREENING ANTAGONISTIC *Bacillus* spp. STRAINS AGAINST *Streptococcus agalactiae* CAUSING POPEYE AND HEMORRHAGE IN TILAPIA (*Oreochromis* sp.)

Le Van Hau^{1*}, Pham Thi Hoa Mai², Le Luu Phuong Hanh¹,

Ngo Huynh Phuong Thao¹

¹Biotechnology Center of Ho Chi Minh city;

²Nguyen Tat Thanh University.

ABSTRACT

Among common diseases in tilapia, popeye and hemorrhage caused by *Streptococcus agalactiae* bacteria are the most common, causing high mortality rates in the table fish production farms during the hot season in summer, leading to the serious economic damage. Recently, the use of bacteria that are resistant to pathogens in aquatic products has been increasingly concerned. Therefore, this study was conducted to screen *Bacillus* spp. strains capable of antagonizing *S. agalactiae* using the diffusion well method. A total of 32 *S. agalactiae* strains were isolated from diseased tilapia cultured in intensive rafts in An Giang, Vinh Long provinces and Ho Chi Minh city. These strains were determined as *S. agalactiae* by morphological, biochemical characteristics and PCR technique. *Bacillus* spp. strain collection from Biotechnology Center Ho Chi Minh City (n = 60) was screened for the antagonistic activity against 12 representative *S. agalactiae* strains from three different geographical regions. The results showed that 18 *Bacillus* spp. strains had strong *in vitro* antagonistic activity against *S. agalactiae* (D > 18 mm). On the other hand, the isolation of *S. agalactiae* indicated a frequent occurrence of this strain circulating in the surveyed geographical regions. Therefore, control of *S. agalactiae* infection in tilapia by antagonistic bacteria is essential and worth of concerning.

Keywords: Antagonize, *Bacillus* spp., *Oreochromis* sp., *Streptococcus agalactiae*, Tilapia

1. MỞ ĐẦU

Theo Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn, sản lượng cá rô phi trong năm 2020 ước hơn 250.000 tấn. Sản phẩm cá rô phi Việt Nam hiện đã xuất khẩu sang 68 quốc gia; trong đó, tiêu thụ mạnh nhất là thị trường Châu Âu và Châu Mỹ (Thông Tấn Xã Việt Nam, 2020). Cá rô phi (*Oreochromis* sp.) được nuôi nhiều ở các tỉnh An Giang, Vĩnh Long, Tiền Giang, ... Hiện nay, *Streptococcus agalactiae* thường gây bệnh phù mắt, xuất huyết trên cá rô phi khi cá nuôi đạt khối lượng từ lớn hơn 100 g đến 1 kg/con, tần suất xuất hiện vi khuẩn *S. agalactiae* trên cá rô phi nuôi tại An Giang và Vĩnh Long rất cao, tỉ lệ nhiễm vi khuẩn này trên cá rô phi từ 95 - 100% và gây thiệt hại nặng nề về kinh tế cho người nuôi (Đinh Thị Thủy, 2007; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012). Trước đây, người dân quen với việc sử dụng kháng sinh để điều trị bệnh, tuy nhiên gần đây việc điều trị bằng kháng sinh không thực sự mang lại hiệu quả do cơ chế kháng kháng sinh của vi khuẩn gây bệnh cũng như dư lượng kháng sinh trong động vật thủy sản và môi trường nuôi đã gây không ít hệ lụy cho ngành nuôi trồng thủy sản.

Kiểm soát sinh học bằng việc sử dụng các dòng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng được hy vọng sẽ trở thành phương pháp hữu ích phòng ngừa và kiểm soát các bệnh do vi khuẩn gây ra (Sadia và Mohammad, 2019). Một nghiên cứu sử dụng *Bacillus subtilis* với phương pháp cho ăn đã nâng cao đáng kể tỉ lệ sống cá rô phi khi cảm nhiễm với *S. iniae* (Addo và cs., 2016), nghiên cứu sử dụng *B. pumilus* AQAHBS01 bổ sung vào thức ăn cá rô phi ở nồng độ 1×10^8 và 10^9 CFU/kg thức ăn cho thấy khả năng tạo phản ứng miễn dịch tăng cao giúp tăng cường khả năng kháng bệnh hiệu quả hơn đối với *S. agalactiae* (Srisapoom và Areechon, 2017). Trong những năm qua, Việt Nam cũng có một số công trình nghiên cứu như phân lập các chủng vi sinh vật có lợi thuộc

nhóm vi khuẩn lactic đối kháng có đặc tính cạnh tranh và lấn át vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* (Ngô Thị Ngọc Trân và cs., 2016), hay nghiên cứu các cao chiết thảo dược có khả năng kháng vi khuẩn *S. agalactiae* (Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs., 2019). Do vậy, ở nghiên cứu này chúng tôi sàng lọc các chủng *Bacillus* spp. có tính đối kháng mạnh với vi khuẩn *S. agalactiae* được phân lập tại An Giang, Vĩnh Long và Thành phố Hồ Chí Minh bằng phương pháp giềng khuếch tán nhằm tìm ra chủng *Bacillus* spp. có tính đối kháng mạnh, hướng đến tạo chế phẩm vi sinh phòng bệnh phù mắt, xuất huyết trên cá rô phi, đồng thời phần nào thay thế việc sử dụng kháng sinh trong quá trình nuôi cá của người dân hiện nay.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phương pháp thu, phân lập và định danh vi khuẩn *S. agalactiae* từ mẫu cá rô phi bệnh

2.1.1. Phương pháp thu và phân lập vi khuẩn *S. agalactiae* từ mẫu cá bệnh

Mẫu cá dùng để phân lập có dấu hiệu lồi mắt, xuất huyết ở thân, góc vây, ... cá có dấu hiệu yếu ớt, tách đàn và bơi lờ đờ; trọng lượng mẫu cá từ 100 - 300 g/con nuôi trong lồng bè trên sông tại địa phận An Giang, Vĩnh Long và Thành phố Hồ Chí Minh; số lượng mẫu cá thu đại diện cho mỗi địa phương là 3 lồng bè, với 3 - 5 mẫu cá/ lồng bè. Thời gian thu mẫu từ tháng 5 năm 2020 đến tháng 12 năm 2020.

Trước khi phân lập vi khuẩn, cá được khử trùng ngoài da bằng cồn 70°C và lau sạch. Sau đó, tiến hành dùng dao và kéo tiết trùng để mổ cá. Cần ghi nhận dấu hiệu bệnh lý bên trong cá. Cắt lấy từng bộ phận nội tạng (gan, thận, lách, ti tạng) và nạo cho vào tube 1,5 mL; tiến hành cấy ria trên đĩa môi trường Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Merck, Germany). Đĩa cấy được ủ trong 24 giờ ở 28°C. Các chủng vi khuẩn phân lập,

sau khi tách dòng thuần được lưu trữ ở -80°C trong glycerol 25%.

2.1.2. Phương pháp định danh vi khuẩn *S. agalactiae*

Xác định các chi tiêu hình thái, sinh hóa các chủng vi khuẩn *S. agalactiae*:

Các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* sau khi được lấy ra từ tủ đông -80°C sẽ được cấy lên môi trường thạch BHIA, ủ ở 28°C trong thời gian từ 24 giờ. Các khuẩn lạc thuần được xác định đặc điểm hình thái bằng phương pháp nhuộm Gram; tính di động của vi khuẩn được quan sát dưới kính hiển vi quang học Axio Vision SE64 ở vật kính 100X (Austin và Austin, 2012).

Các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* được xác định kiểu huyết thanh bằng phương pháp ngưng kết miễn dịch với kit Wellcogen Strep B (Oxoid, UK).

Kiểm tra dung huyết (khả năng gây tan huyết) các chủng vi khuẩn *S. agalactiae*:

Sử dụng que cấy nhựa vô trùng cấy ria một khuẩn lạc đơn của vi khuẩn khảo sát lên đĩa môi trường Blood agar (Himedia, India) + 5% máu cừu (Công ty Nam Khoa) đã hấp vô trùng; ủ đĩa ở 28°C trong 24 giờ. Sau đó đọc kết quả (α haemolytic: dung huyết không hoàn toàn, β haemolytic: dung huyết hoàn toàn, γ haemolytic: không dung huyết) (Frerichs và Millar, 1993).

Kiểm tra khả năng kháng kháng sinh của các chủng vi khuẩn *S. agalactiae*:

Dịch huyền phù của các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* sau thời gian nuôi cấy trong môi trường BHI lỏng ở 28°C và 250 rpm, mật độ đạt 10^9 CFU/mL ($OD_{620} = 1,2$); sẽ được tiến hành ly tâm 4.000 rpm, 4°C, 20 phút sau đó thu cặn và hòa với nước muối 0,85% và pha loãng với độ đục tương ứng $OD_{620} = 0,5$ (tương ứng 10^6 CFU/mL). Dùng 100 μ L dịch huyền phù chỉ thị *S. agalactiae* cấy trải đều trên đĩa môi trường Mueller Hinton Agar (MHA, Himedia, India) đã khử trùng, để khô tự nhiên, sử

dụng các loại đĩa giấy tẩm kháng sinh (Oxoid, UK) gồm: Oxytetracycline, Oxolinic acid, Doxycycline, Tetracycline, Florfenicol, Amoxicillin, Trimethoprim đặt trên mặt đĩa thạch, sau đó ủ các đĩa thạch ở 28°C trong 24 giờ. Đọc kết quả đường kính vòng vô khuẩn D (mm) (CLSI, 2015).

Định danh các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* bằng phương pháp PCR:

Li trích DNA của vi khuẩn: Các chủng vi khuẩn sau khi nuôi tăng sinh trong môi trường BHI lỏng (Merck, Germany) được chiết tách DNA bằng kit Omega Biotek (USA).

Quy trình PCR phát hiện *S. agalactiae*: Quy trình được thực hiện với trình tự đoạn môi: F1 (5' GAGTTTGATCATGGGTCAG 3') và IMOD (5' ACCAACATGTGTTAATTACTC 3') (Channarong và cs., 2012). Chu kỳ nhiệt của phản ứng bao gồm: 95°C trong 5 phút; sau đó thực hiện 95°C trong 1 phút, 58°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút, lặp lại chu kỳ trên trong 35 lần; 7 phút ở 72°C. Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên gel 1% agarose (abm) trong dung dịch đệm TAE 0.5X (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0.1 mM EDTA). Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với DNA của vi khuẩn *S. agalactiae* có kích thước tương ứng 220 bp.

2.2. Nguồn vi khuẩn *Bacillus* spp.

Các chủng *Bacillus* spp. sử dụng trong thí nghiệm xác định tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* thuộc bộ sưu tập các dòng vi khuẩn có lợi của Phòng Công nghệ Sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh được lưu giữ trong tủ đông -80°C. Bộ sưu tập các chủng *Bacillus* spp. này được phân lập từ mẫu bùn đáy ao, mẫu nước ao nuôi, mẫu cá tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long đã được kiểm tra sinh lý sinh hóa, định danh sinh học phân tử với môi 16S và *Baseq* (Lê Lưu Phương Hạnh và cs., 2015,

2017; Lê Văn Hậu và cs., 2021). Các chủng *Bacillus* spp. sẽ được phục hồi bằng cách cấy ria trên đĩa Tryptone Soya Agar (TSA, HiMedia, India), ủ 37°C trong 18 - 24 giờ. Sau đó, các chủng này sẽ được tăng sinh trong môi trường dinh dưỡng Tryptone Soya Broth (TSB, HiMedia, India) và dùng để sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.3. Xác định tính đối kháng vi khuẩn *S. agalactiae* của các chủng *Bacillus* spp.

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. được hoạt hóa trong Tryptone Soya Broth (TSB, HiMedia, India), vi khuẩn sẽ được nuôi cấy lắc ở 37°C, 250 rpm trong 18 - 24 giờ. Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* được nuôi cấy trên môi trường BHI lỏng (Meck, Germany) ở 28°C, 250 rpm trong 24 giờ.

Dịch huyền phù vi khuẩn *Bacillus* spp. khảo sát sau thời gian nuôi cấy tiến hành li tâm 4.000 rpm, 4°C, 20 phút; tiến hành thu cặn và hòa với Phosphate Buffer Saline (PBS 1X) sao cho độ đục đạt OD₆₂₀ = 1,2 (tương ứng 10⁸ CFU/mL).

Dịch huyền phù vi khuẩn *S. agalactiae* sau thời gian nuôi cấy, mật độ đạt 10⁹ CFU/mL (OD₆₂₀ = 1,0); ly tâm 4.000 rpm, 4°C, 20 phút sau đó thu cặn và hòa với nước vô trùng 0,85% NaCl và pha loãng để có độ đục tương ứng OD₆₂₀ = 0,5 (tương ứng 10⁶ CFU/mL).

Dùng 100 µL dịch huyền phù chỉ thị *S. agalactiae* (OD₆₂₀ = 0,5) cấy trải đều trên môi trường Mueller Hinton Agar (MHA,

HiMedia, India) đã khử trùng, để khô tự nhiên. Tiến hành tạo các giếng trên đĩa thạch bằng dụng cụ kim loại chuyên biệt (đường kính 6 mm) được khử trùng trên ngọn đèn cồn để lấy đi phần thạch ra khỏi giếng. Lần lượt nhỏ 10 µL dịch vi khuẩn *Bacillus* spp. khảo sát vào từng giếng thạch, để yên sau 60 phút cho khô tự nhiên sau đó ủ các đĩa thạch trong 24 giờ ở 28°C. Sau đó kiểm tra đường kính vòng vô khuẩn D (mm) xuất hiện tại vị trí các giếng thạch.

Mức độ đối kháng được đánh giá dựa vào vòng đối kháng D: Không đối kháng (D = 0 mm); Đối kháng yếu (D < 10 mm); Đối kháng trung bình (11 < D < 14 mm); Đối kháng mạnh (D > 15 mm) (Tagg và McGiven, 1971).

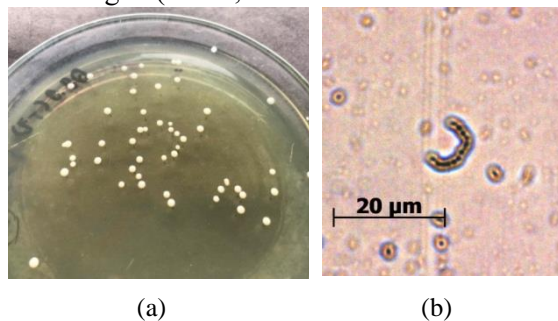
Hoạt tính kháng khuẩn được tính theo công thức:

$$AU/mL = (D \times 1.000)/V \text{ (dịch khuẩn cho vào giếng) } (\mu L) \text{ (Iyapparaj và cs., 2013).}$$

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh vi khuẩn

Phân lập được 32 chủng vi khuẩn từ cá rô phi có dấu hiệu phù mắt, xuất huyết. Sau khi cấy từ mẫu não và thận cá trên môi trường BHIA, ủ ở 28°C trong thời gian 48 giờ, tất cả các mẫu cấy đều xuất hiện dạng khuẩn lạc đặc trưng trên đĩa thạch: khuẩn lạc đơn có màu trắng đục, tròn lồi không rìa (Hình 1a).



Hình 1. (a) Khuẩn lạc *S. agalactiae* màu trắng đục, tròn lồi trên môi trường BHIA; (b) nhuộm Gram, 100X vi khuẩn (liên cầu khuẩn)

Tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được xác định là vi khuẩn gram + bắt màu tím, dạng liên cầu khuẩn (Hình 1b), phản ứng âm tính với oxidase và catalase và không có khả năng di động. Đặc điểm của các chủng vi khuẩn này phù hợp với mô tả của các nhóm tác giả trước (Buller, 2004; Đồng Thanh Hà và cs., 2010; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012; Phạm Hồng Quân và cs., 2013). Gần đây nhất với nghiên cứu phân lập

và xác định một số đặc điểm sinh học các chủng *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi đốm nuôi tại Thừa Thiên Huế xác nhận một lần nữa các đặc điểm sinh hoá trong nghiên cứu này là phù hợp (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2019). Kết quả quan sát và phân tích các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá rô phi bệnh phù mắt, xuất huyết được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Đặc điểm hình thái, sinh hóa của vi khuẩn phân lập từ cá rô phi bệnh phù mắt và xuất huyết

Chỉ tiêu đánh giá	Chủng vi khuẩn phân lập (n = 32)	Buller (2004)
Nhuộm Gram	Gram +	Gram +
Hình dạng	Liên cầu khuẩn	Liên cầu khuẩn
Catalaza	-	-
Oxidaza	-	-
Di động	-	-
Dung huyết	γ	

(+) dương tính; (-) âm tính; (γ) không gây tan huyết

Trong nghiên cứu này, phản ứng ngưng kết miễn dịch nhằm giúp nhận dạng nhanh kiểu huyết thanh của vi khuẩn *S. agalactiae*. Kết quả cho thấy 32/32 mẫu vi

khẩn đều tạo ngưng kết (Hình 2) giúp phát hiện nhanh các chủng phân lập đều là *S. agalactiae* nhóm B (GBS).



Hình 2. Phản ứng xác định kiểu huyết thanh chủng vi khuẩn SAG.5 phân lập được từ cá rô phi bệnh cho thấy ngưng kết xảy ra (nhóm B) bằng kit Wellcogen Strep B (Oxoid, UK).

Kết quả kiểm tra dung huyết cho thấy cả 32/32 chủng phân lập phát triển tốt trên môi trường thạch máu và không có khả năng gây tan huyết (dung huyết γ) (Hình 3). Kết quả này tương tự như nghiên cứu của tác giả Đồng Thanh Hà và cs. (2010); Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương

(2012). Tuy nhiên kết quả trong nghiên cứu này có sự khác biệt với kết quả phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học các chủng *S. agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi đốm nuôi tại Thừa Thiên Huế với 27 chủng *S. agalactiae* phân lập gây tan huyết β đồng nhất (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2019).



Hình 3. Kiểm tra khả năng gây tan huyết (dung huyết γ) của chủng *S. agalactiae* cấy trên môi trường Blood agar + 5% máu cừu.

Kết quả kiểm tra tính mẫn cảm với 7 loại kháng sinh của 6 chủng *S. agalactiae* gồm: SAG.5; SAG.11; SQ9.5; SQ9.9; SVL.29; SVL.32 đại diện cho 3 vùng địa lý được thể hiện ở Bảng 2 cho thấy khả năng mẫn cảm với kháng sinh từ yếu đến mạnh của các chủng *S. agalactiae* được thể hiện qua vòng đối kháng ($D = \text{mm}$).

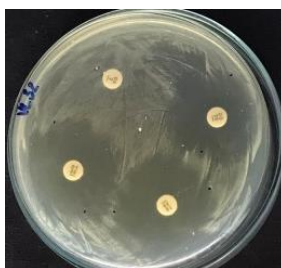
Bảng 2. Kiểm tra mức độ nhạy cảm kháng sinh của các chủng *S. agalactiae*

Kháng sinh (Ký hiệu, nồng độ μg)	Mức độ nhạy cảm kháng sinh ($D = \text{mm}$)					
	SAG.5	S.AG.11	SQ9.5	SQ9.9	SVL.29	SVL.32
Oxytetracycline (OT30)	++	++	++	++	++	+++
Oxolinic acid (OA2)	-	-	-	-	-	-
Doxycycline (DO30)	++	++	++	++	++	+++
Tetracycline (TE30)	++	++	++	++	++	+++
Florfenicol (FFC30)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Amoxicillin (AMC30)	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Trimethoprim (W1.25)	-	-	-	-	-	-

(-): kháng hoàn toàn kháng sinh $D = 0 \text{ mm}$; (+): kháng yếu $D \leq 14 \text{ mm}$; (++) : kháng trung bình $15 < D < 19 \text{ mm}$; (+++): nhạy cảm với kháng sinh $D \geq 20 \text{ mm}$. (CLSI, 2015).

Qua Bảng 2 cho thấy 100% các chủng *S. agalactiae* kiểm tra kháng hoàn toàn với Oxolinic acid và Trimethoprim, 100% nhạy cảm với 2 loại kháng sinh Florfenicol (FFC30) và Amoxicillin (AMC30). Kết quả tương tự với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs. (2019) cho thấy các chủng *S. agalactiae* SA3 và SA4 nhạy cảm với kháng sinh Doxycycline (DO30) và Amoxicillin (AMC10). Tuy nhiên, với nghiên cứu của tác giả Nguyễn Ngọc Phước và cs. (2015) kiểm tra khả năng mẫn cảm của *S. agalactiae* với Amoxicilline (AMC10) ghi

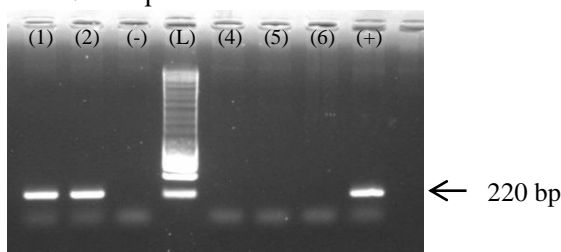
nhận có 50% chủng mẫn cảm và có 20/20 chủng *S. agalactiae* thuộc hai kiểu huyết thanh Ib và III đều kháng với kháng sinh Oxytetracycline (Nguyễn Ngọc Phước và cs., 2020). Bên cạnh đó, đối với chủng SVL.32 trong nghiên cứu này mẫn cảm với 5 loại kháng sinh, cho thấy ở các chủng *S. agalactiae* rất đa dạng về tính mẫn cảm kháng sinh tùy thuộc vùng địa lý khác nhau. Mặt khác, nghiên cứu sử dụng kháng sinh Doxycycline 100 mg/kg thức ăn điều trị bệnh trên cá rô phi cho thấy vi khuẩn gây bệnh mẫn cảm với Doxycycline (Nguyễn Việt Khuê, 2009).



Hình 4. Kết quả kiểm tra khả năng kháng kháng sinh của chủng *S. agalactiae* VL32

Kỹ thuật định danh các chủng *S. agalactiae* bằng phương pháp PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu F1/IMOD, đã định danh được 32 chủng *S. agalactiae* phân lập tại 3 vùng địa lý gồm: Vĩnh Long, An Giang, Quận 9 - Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả

điện di DNA trên gel 1% agarose thể hiện ở hình 5 là hình ảnh điện di DNA của 2 chủng vi khuẩn AG5 và VL32, đại diện cho DNA của 32 chủng vi khuẩn đã được tiến hành điện di và cho kết quả tương tự.



Hình 5. Kết quả điện di DNA trên gel 1% agarose (abm). Trong đó: (1): DNA vi khuẩn AG5; (2): DNA vi khuẩn VL32; (L) Thang DNA Hyperladder 1kb (Bioline), (4): DNA vi khuẩn *E. ictaluri*; (5): DNA vi khuẩn *A. hydrophila* (6): DNA vi khuẩn *F. columnare* (-) Đối chứng âm, (+) Đối chứng dương *S.a* NNP (Đại học Nông Lâm Huế).

Qua kết quả điện di có tất cả 32 mẫu xuất hiện vạch có kích thước phù hợp tương ứng 220 bp. Như vậy, các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá rô phi bệnh phù mắt xuất huyết được xác định là *S. agalactiae*. Kết quả tương tự như nghiên cứu của các tác giả trước khi sử dụng cặp mồi F1/IMOD để khuếch đại (Channarong và cs., 2012; Trần Thị Tuyết Hoa và cs., 2016).

3.2. Kiểm tra hoạt tính đối kháng giữa bộ chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. với các chủng vi khuẩn *S. agalactiae* phân lập được

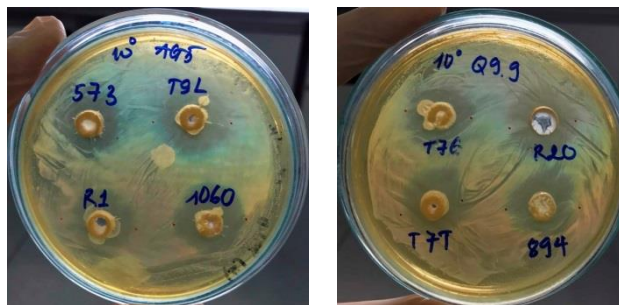
Nghiên cứu đã sàng lọc được 18 trong tổng số 60 chủng *Bacillus* spp. có tính đối kháng mạnh ($D > 18$ mm), chỉ tiết đường kính vô khuẩn ($D = 0$ mm) và hoạt tính kháng khuẩn đối với 12 chủng *S. agalactiae* đại diện được ghi nhận sau 24 giờ tại Bảng 3.

Bảng 3. Đường kính vô khuẩn D (mm) và hoạt tính kháng khuẩn (AU/mL) của các chủng *Bacillus* spp. đối với 12 chủng *S. agalactiae* đại diện

Ký hiệu chủng <i>Bacillus</i> spp.	Đường kính vòng vô khuẩn D (mm)	Hoạt tính kháng khuẩn (AU/mL)
B.444	20 - 21	2.000 - 2.100
B.573	19 - 20	1.900 - 2.000
B.1060	20 - 22	2.000 - 2.200
B.T7T	18 - 20	1.800 - 2.000
B.T7G	20 - 21	2.000 - 2.100
B.T9L	19 - 20	1.900 - 2.000
B.R1	20 - 22	2.000 - 2.200
B.R20	18 - 19	1.800 - 1.900
B.894	19 - 20	1.900 - 2.000
B.CS13	19 - 21	1.900 - 2.100
B.CS18	20 - 22	2.000 - 2.200
B.DH3	19 - 21	1.900 - 2.100
B.DH9	18 - 20	1.800 - 2.000
B.DH19	19 - 21	1.900 - 2.100
B.RP16	21 - 22	2.100 - 2.200
B.RP30	19 - 21	1.900 - 2.100
B.RP33	20 - 22	2.000 - 2.200
B.RP37	20 - 22	2.000 - 2.200

Kết quả kiểm tra hoạt tính đối kháng tại Hình 6 xuất hiện vòng vô khuẩn thể hiện tính đối kháng giữa 8 chủng *Bacillus* B.573, B.T9L, B.R1, B.1060, B.T7G, B.R20, B.T7T và B.894 với 2 chủng *S. agalactiae*

AG5 và Q9.9 đại diện của 18 chủng *Bacillus* spp. và 12 chủng *S. agalactiae* đã được tiến hành kiểm tra và cho kết quả tương tự.



Hình 6. Kết quả kiểm tra hoạt tính đối kháng được thể hiện qua vòng vô khuẩn D (mm) xuất hiện trên đĩa thạch MHA sau 24 giờ ủ ở nhiệt độ 28°C giữa các chủng *Bacillus* B.573; B.T9L; B.R1; B.1060; B.T7G; B.R20; B.T7T và B.894 với 2 chủng *S. agalactiae* AG5 và Q9.9

Theo Ngô Thị Ngọc Trân và cs. (2016) đã có công trình nghiên cứu xác định tính kháng khuẩn của vi khuẩn lactic với vi khuẩn *S. agalactiae* kết quả cho thấy có 11 chủng vi khuẩn lactic có khả năng ức chế đến 8 chủng trong tổng số 30 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* với đường kính vô khuẩn dao động từ yếu đến mạnh (6 mm <

D < 20 mm). Tuy nhiên, để ứng dụng vi khuẩn lactic trong sản xuất chế phẩm sinh học sẽ gặp khó khăn hơn nhiều trong việc bảo quản so với *Bacillus* spp. vì vi khuẩn lactic không sinh bào tử. Một nghiên cứu khác đã sử dụng vi khuẩn *B. pumilus* AQAHBS01 phân lập từ cá rô phi khi phối trộn với thức ăn, kết quả cho thấy phản ứng

miễn dịch được nâng lên rõ rệt ở nhóm cá ăn *B. pumilus* nồng độ 1×10^8 và 10^9 CFU/kg thức ăn, hoạt động thực bào tăng cao cùng với chỉ số superoxide anion, đồng thời khả năng kháng bệnh hiệu quả hơn đối với cá ở lô đối chứng và lô cá cho ăn *B. pumilus* ở nồng độ thấp hơn 10^7 CFU/kg thức ăn (Srisapoomee và Areechon, 2017). Ngoài ra, khi cho cá rô phi ăn thức ăn có trộn *B. subtilis* mật độ 4×10^7 CFU/g liên tục trong 21 ngày, kết quả tỉ lệ sống của cá thí nghiệm đạt 44 - 77,3% sau khi cá được cảm nhiễm với *S. iniae* mật độ 8×10^6 CFU/cá (Addo và cs., 2016). Qua kết quả kiểm tra khả năng đối kháng tại Bảng 3 cho thấy các chủng *Bacillus* spp. trong nghiên cứu này có tính đối kháng cao hơn tính đối kháng của cao chiết vò quế đối với chủng *S. agalactiae* SA3 (D = 16,25 - 17,67 mm) trong nghiên cứu của chính tác giả (Nguyễn Thị Trúc Quyên và cs., 2019). Kết quả kiểm tra khả năng đối kháng của các chủng *Bacillus* spp. với *S. agalactiae* bằng phương pháp giếng khuếch tán trong báo cáo này được xác định theo cơ chế tương tự trong nghiên cứu xác định cơ chế hoạt động đối kháng của chủng *Bacillus* với vi khuẩn gây bệnh đã thực hiện trong nghiên cứu trước đây của Lê Lưu Phương Hạnh và cs. (2021).

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này đã phân lập được 32 chủng vi khuẩn *S. agalactiae* ở 3 vùng địa lý An Giang, Vĩnh Long, Thành phố Hồ Chí Minh; đồng thời sàng lọc được mười tám (18) chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. có khả năng đối kháng mạnh với mười hai (12) chủng *S. agalactiae* đại diện của 3 vùng địa lý An Giang, Vĩnh Long và Thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả có thể hướng đến các nghiên cứu sản xuất chế phẩm sinh học

phòng bệnh phù mắt, xuất huyết trên cá rô phi.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong bài báo này được thực hiện với sự hỗ trợ các trang thiết bị, vật tư hoá chất của Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh và sử dụng nguồn kinh phí của Sở Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn Thành phố Hồ Chí Minh cấp cho thực hiện nhiệm vụ thường xuyên hàng năm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu Tiếng Việt

- Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương. (2012). Phân lập và xác định đặc điểm của vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* từ cá điêu hồng (*Oreochromis* sp.) bệnh mù mắt và xuất huyết. *Tạp chí khoa học, Trường đại học Cần Thơ*, 22(c), 203-212.
- Đinh Thị Thủy. (2007). *Nghiên cứu các bệnh nguy hiểm thường gặp ở cá rô phi nuôi thâm canh*. Hà Nội: Liên hiệp các hội Khoa học và Kỹ thuật Việt Nam.
- Đồng Thanh Hà, Nguyễn Viêt Khuê và Nguyễn Thị Hạnh. (2010). *Một số đặc điểm của Streptococcus agalactiae, tác nhân gây bệnh Streptococcosis trên cá rô phi ở miền Bắc Việt Nam*. Báo cáo khoa học - Trung tâm nghiên cứu quan trắc cảnh báo môi trường và phòng ngừa dịch bệnh thủy sản miền Bắc - Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I.
- Lê Lưu Phương Hạnh, Lê Văn Hậu và Nguyễn Quốc Bình. (2015). *Phân lập, khảo sát một số chủng probiotic đối kháng với vi khuẩn Edwardsiella ictaluri nhằm hỗ trợ hiệu quả bảo vệ của vaccine nhược độc phòng bệnh gan thận mũ trên cá Tra*. Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp cơ sở, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.
- Lê Lưu Phương Hạnh, Lê Văn Hậu, Trần Văn Hương và Nguyễn Quốc Bình. (2017). *Xác định tính đối kháng của các chủng probiotic trong môi trường nuôi cá tra*. Báo cáo nghiệm thu đề tài cấp cơ sở, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.
- Lê Lưu Phương Hạnh, Nguyễn Hoàng Chi Mai, Trần Ngọc Phương Linh, Lê Văn Hậu, Nguyễn Đăng Quân và Ngô Huỳnh Phương

- Thào. (2021). Hoạt động đối kháng của chủng *Bacillus amyloliquefaciens* B894 với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 1(122), 113-119.
- Lê Văn Hậu, Lê Lưu Phương Hạnh, Lê Thị Thu Thảo và Bùi Nguyễn Chí Hiếu. (2021). *Xác định chủng Bacillus có tính đối kháng Flavobacterium columnare và Streptococcus agalactiae gây bệnh trên cá tra và rô phi*. Nhiệm vụ thường xuyên theo chức năng, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.
- Ngô Thị Ngọc Trân, Nguyễn Trọng Nghĩa và Đặng Thị Hoàng Oanh. (2016). Xác định tính kháng khuẩn của vi khuẩn lactic với vi khuẩn (*Streptococcus agalactiae*) phân lập từ cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) bệnh phù mắt và xuất huyết. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 42b, 48-55.
- Nguyễn Ngọc Phước, Lưu Thị Ngọc Hạnh, Nguyễn Thị Sao, Nguyễn Đức Quỳnh Anh, Trương Thị Hoa và Lê Văn Bảo Duy. (2015). Nghiên cứu một số đặc điểm sinh hóa vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học - Đại học Huế*, 104(05), 207-219.
- Nguyễn Ngọc Phước, Nguyễn Thị Huệ Linh và Nguyễn Thị Xuân Hồng. (2020). Phân lập và xác định đặc điểm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên ếch Thái Lan nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, (2), 58-65.
- Nguyễn Ngọc Phước, Trần Thị Nhật Anh và Nguyễn Thị Huệ Linh. (2019). Phân lập và xác định một số đặc điểm sinh học các chủng *Streptococcus agalactiae* gây bệnh trên cá rô phi đỏ (*Oreochromis* sp.) nuôi tại Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế*, 3(3), 1591-1601.
- Nguyễn Thị Trúc Quyên, Lê Linh Chi, Đoàn Văn Cường, Nguyễn Diễm Thư, Mã Tú Lan, Trần Hoàng Bích Ngọc, Nguyễn Thành Nhân và Nguyễn Thị Ngọc Tĩnh. (2019). Khả năng đối kháng vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* phân lập trên cá rô phi (*Oreochromis* spp.) bởi một số cao chiết thảo dược. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản, Đại học Nha Trang*, (3), 124-132.
- Nguyễn Việt Khuê. (2009). *Xác định nguyên nhân gây chết cá rô phi nuôi thương phẩm tại một số tỉnh miền Bắc*. Thông báo công trình khoa học, chủ đề: Thủy sản. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I.
- Phạm Hồng Quân, Hồ Thu Thủy, Nguyễn Hữu Vũ, Huỳnh Thị Mỹ Lệ và Lê Văn Khoa. (2013). Một số đặc tính sinh học của vi khuẩn *Streptococcus* spp. gây bệnh xuất huyết ở cá rô phi nuôi tại một số tỉnh Miền bắc Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 11(4), 506-513.
- Thông Tấn Xã Việt Nam. (18/08/2020). *Dịch Covid-19: Nhiều triển vọng xuất khẩu cá rô phi*. Khai thác từ <https://bnews.vn/dich-covid-19-nhieu-trien-vong-xuat-khau-ca-ro-phi/166663.html>

2. Tài liệu tiếng nước ngoài

- Addo, S., Carrias, A. A., Williams, M. A., Liles, M. R., Terhune, J. S., & Liles, M. R. (2016). Effects of *Bacillus subtilis* strains on growth, immune parameters, and *Streptococcus iniae* susceptibility in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of the World Aquaculture Society*. DOI:10.1111/jwas.12380
- Austin, B., & Austin, D. (2012). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*, 5th edition. Springer Science and Business Media Dordrecht, London.
- Barrow, G. I., & Feltham, R. K. A. (1993). *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge. 262
- Buller, N. B. (2004). *Bacteria from fish and other aquatic animals: a practice identification manual*, p361.
- Channarong, R., Pattanon, K., Nopadon, P., & Janenuj, W. (2012). Duplex PCR for Simultaneous and Unambiguous Detection of *Streptococcus iniae* and *Streptococcus agalactiae* associated with Streptococcosis of Cultured Tilapia in Thailand. *Thai Journal Veterinary Medicine*, 42(2), 153-158.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2015). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. USA

- (Pennsylvania): Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Frerichs, G. N., & Millar, S. D. (1993). *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens*. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland. 107 pages.
- Iyapparaj, P., Maruthiah, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S., Kumar, C., Immanuel, G., & Palavesam, A. (2013). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquatic Biosystems*, 9(12), 1-10. DOI:10.1186/2046-9063-9-12
- Sadia, A., & Mohammad, N. I. B. (2019). Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* against multidrug resistant *Serratia rubidaea*. *BioRxiv the preprint server for biology*. DOI:10.1101/818054
- Srisapome, P., & Areechon, N. (2017). Efficacy of viable *Bacillus pumilus* isolated from farmed fish on immune responses and increased disease resistance in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Laboratory and on-farm trials. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 199-210. DOI:10.1016/j.fsi.2017.06.018
- Tagg, J. R., & Mc Given, A. R. (1971). Bacteriocin activity can be detected and assayed by a modification of the punchhole method. *Applied Microbiology*, 21(5), p. 943