

ẢNH HƯỞNG CỦA PROBIOTIC LÊN HỆ MIỄN DỊCH TỰ NHIÊN VÀ SỨC ĐỀ KHÁNG CỦA CÁ TRA KHÁNG BỆNH GAN THẬN MỦ GÂY RA BỞI *EDWARDSIELLA ICTALURI*

DIETARY ADMINISTRATION OF THE PROBIOTIC ENHANCED INNATE IMMUNE RESPONSES AND DISEASE RESISTANCE OF THE STRIPED CATFISH AGAINST *EDWARDSIELLA ICTALURI*

Võ Minh Sơn, Văn Thị Thuý*, Nguyễn Thị Ngọc Tình

ABSTRACT

Antagonistic activity of *Bacillus circulans* B3 (B3), *Bacillus subtilis* N26.3 (N26.3), *Pediococcus acidilactici* LA61 (LA61) with *Edwardsiella ictaluri* were evaluated, and non-specific immune parameters of the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*), and its susceptibility to *Edwardsiella ictaluri* Gly09M were determined when the fish fed diets containing single strains of B3, N26.3, LA61, and mixed strains (B3, N26.3, LA61) at 1×10^7 cfu/g of feed for 4 weeks. The results showed that B3, N26.3, and LA61 bacteria inhibited to *E. ictaluri* with the clear zone 22.5 ± 0.7 mm, 20.3 ± 0.6 mm, and 17.7 ± 1.5 mm, respectively. Fish fed a diet containing LA61 and mixed strains at 10^7 cfu g⁻¹ had significantly higher survival rates than those fed the control diet after challenge with *E. ictaluri* Gly09M, causing increases in the survival rates of 22.2% and 42.2%, respectively, compared to the control group. The phagocytic activity (PA) and respiratory burst of head kidney leucocytes of fish fed single strain diets and mixed strain diet at 10^7 cfu g⁻¹ were significantly higher than those of fish fed the control diet after 4 weeks of feeding. However, phagocytic index (PI) had no significant difference between groups. Lysozyme activity of fish serum of fish fed LA61 and mixed strain diet at 10^7 cfu/g significantly increased compared to those of fish fed control diet, and had increased by 1,6- and 2,3-fold, respectively compared to control group. We therefore recommend dietary administration of mixed strains (B3, N26.3, and LA61) at 10^7 cfu g⁻¹ to enhance innate immunity and disease resistance of *Pagasianodon hypophthalmus* against Bacillary Necrosis of Pangasius (BNP) causing by *E. ictaluri*.

Keywords: probiotic, innate immune, disease resistance, *Edwardsiella ictaluri*, *Pangasianodon hypophthalmus*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sản lượng cá tra tăng rất nhanh chóng trong những năm gần đây. Cùng với sản lượng tăng, ô nhiễm môi trường và dịch bệnh bùng phát đã gây thiệt hại kinh tế cho người nuôi. Có nhiều bệnh được phát hiện trên cá tra như bệnh do nấm *Achlya* sp. (Lý Thị Thanh Loan et al., 2007), bệnh nhiễm trùng máu (MAS) do vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (Crumlish et al., 2010; Subagja et al., 1999), và bệnh gan thận mủ (BNP) gây ra bởi *Edwardsiella ictaluri* (Crumlish et al., 2002; Ferguson et al., 2001). Trong đó bệnh gan thận mủ (BNP) xảy ra ở hầu hết các giai đoạn phát triển của cá tra. Trong một vụ nuôi, bệnh có thể xuất hiện 3-4 lần, đặc biệt ở giai đoạn cá giống gây thiệt hại rất lớn, tỉ lệ hao hụt lên đến 90% nếu không chữa trị kịp thời (Dung et al., 2003; Nguyễn Văn Hào et al., 2000-2003). Phương pháp phòng và trị bệnh truyền thống đã lạm dụng sử dụng thuốc kháng sinh và hóa chất diệt khuẩn đã gia tăng những chủng vi khuẩn gây bệnh kháng kháng sinh đặc biệt là vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ (*E. ictaluri*) trên cá tra (Dung et al., 2008; Nguyễn Hữu Thịnh và Trương Thanh Loan, 2007). Để thay thế dần dần phương pháp phòng bệnh truyền thống, phương pháp phòng và trị bệnh bằng liệu pháp sinh học ngày càng được ưa chuộng như vaccine, các chất tăng cường hệ miễn dịch (immunostimulants), chế phẩm sinh học (probiotic). Nghiên cứu về vaccine ứng dụng trên cá tra vẫn đang được nhiều nhà khoa học quan tâm. Vaccine được cho là phương pháp hiệu quả nhất trong phòng ngừa một số bệnh gây ra bởi vi khuẩn và virus, nhưng chưa được sử dụng phổ biến có thể là do giá thành quá cao, thời gian nghiên cứu lâu và thường gây sốc cho cá (Ellis, 1988). Nhiều nghiên cứu và ứng dụng thành công việc sử dụng các chất tăng cường hệ miễn dịch tự nhiên và có phổ phòng ngừa bệnh rộng trên các động vật thủy sản (Bricknell and

Dalmo, 2005; Sakai, 1999). Hơn thế nữa, phương pháp trị liệu sinh học bằng vi sinh vật có lợi (probiotic) được mong đợi và trở thành công cụ phòng ngừa, điều trị nhiều bệnh hiệu quả trong nuôi trồng thủy sản (Balcázar et al., 2006; Gatesoupe, 1999; Irianto and Austin, 2002; Vine et al., 2006). Probiotic bao gồm nhóm như tảo (*Tetraselmis*), nấm men (*Debaryomyces*, *Phaffia*, và *Saccharomyces*), vi khuẩn gram dương (*Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Streptococcus* và *Weissella*) và gram âm (*Aeromonas*, *Alteromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, và *Vibrio*) đã được sử dụng thành công trên các đối tượng giáp xác, cá, và động vật thân mềm (Irianto and Austin, 2002). Các vi khuẩn thuộc nhóm vi khuẩn lactic, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, ... có khả năng tiết ra các hợp chất kháng khuẩn như acid hữu cơ, hydrogen peroxide, carbon dioxide, siderophore và bacteriocin ứng chế sự phát triển của các vi sinh vật gây bệnh (*A. hydrophila*, *A. salmonicida*, *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium damsela piscicida*, ...) (Gatesoupe, 1999; Verschuere et al., 2000; Vine et al., 2006). Nhóm vi khuẩn *Bacillus* ngày nay được sử dụng phổ biến do có chúng có nhiều đặc tính ưu việt như có khả năng chịu đựng pH thấp trong dạ dày, điều hòa miễn dịch, tiết ra các chất kháng khuẩn (Hong et al., 2005). Gần đây có nhiều nghiên cứu nhóm *Bacillus* spp. có khả năng tiết ra enzyme N-acyl-homoserine lactonase phân cắt phân tử tín hiệu quorum sensing (Defoirdt et al., 2011; Dong et al., 2000; Lee et al., 2002) nhằm làm giảm độc lực của các vi khuẩn gram âm gây bệnh cho động vật thủy sản. Nhiều nghiên cứu ứng dụng thành công các chủng vi khuẩn lactic và *Bacillus* spp. có khả năng tăng cường tỉ lệ sống nhiều loài cá như cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*), cá rô phi (*Oreochromis niloticus*), cá hồi Đại tây dương (*Salmo salar*), cá bơn (*Paralichthys olivaceus*) (Balcázar et al., 2007; Pirarat et al., 2006; Robertson et al., 2000; Taoka et al., 2006).

Tuy nhiên có rất ít nghiên cứu ứng dụng probiotic cho cá da trơn (catfish). Shelby và đồng tác giả (2007) đã thử nghiệm sử dụng các loại chế phẩm vi sinh như Biomate ST-20 (*Enterococcus faecium*), Bioplus 2B (*B. subtilis*, *B. licheniformis*), Bactocell PAMD (*Pediococcus acidilactici*), LA-51 (*Lactobacillus* spp.), Clear-Flo 1002 (11 loài *Bacillus* spp.), Clear-Flo 1005 (14 vi khuẩn gram dương và 8 vi khuẩn gram âm), Clear-Flo 1006 (6 vi khuẩn gram dương và 10 vi khuẩn gram âm) bổ sung vào thức ăn của cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*, cá giống) và cho ăn trong vòng 5-8 tuần. Kết quả cho thấy sản phẩm probiotic Biomate ST-20 và Bactocell PAMD có tỉ lệ bảo hộ RPS đạt từ 30%-68%, tuy nhiên tỉ lệ sống không có sự khác biệt giữa lô thí nghiệm và đối chứng. Một nghiên cứu gần đây nhất chứng tỏ probiotic (*Bacillus* spp.) có tác dụng tăng cường tỉ lệ sống cá nheo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) và cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) với tỉ lệ bảo hộ đạt 13,5%-15,2% đối với cá nheo Mỹ và 19,6% đến 86,3% đối với cá tra sau khi gây nhiễm với *E. ictaluri* (Ran et al., 2012). Hệ miễn dịch tự nhiên đóng vai trò quan trọng trong cơ chế bảo vệ của cá chống lại các mầm bệnh. Mục đích của nghiên cứu này nhằm đánh giá các thông số miễn dịch tự nhiên như hoạt động thực bào, sản sinh oxy hoạt hoá, hoạt tính lysozyme của cá tra và sức đề kháng của chúng sau khi cảm nhiễm với *Edwardsiella ictaluri* Gly09M sau khi cho ăn thức ăn trộn vi khuẩn đôn chủng *Bacillus circulans* B3, *B. subtilis* N26.3, và *Pediococcus acidilactici* LA61 và hỗn hợp 3 chủng.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu

Cá tra giống (15-20g/con) được cung cấp từ Trung Tâm Quốc Gia Giống Thủy Sản Nam Bộ, Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II. Chủng vi khuẩn khảo sát bao gồm: *Bacillus circulans* B3 (viết tắt B3, phân lập từ bùn), *B. subtilis* N26.3 (viết tắt N26.3, phân lập từ nước), *Pediococcus acidilactici* LA61 (viết tắt LA61, phân lập từ hệ tiêu hoá). Vi khuẩn gây bệnh gan thận mũ *Edwardsiella ictaluri* Gly09M trên cá tra nhận từ Trung Tâm Quốc Gia Quan Trắc Cảnh Báo Môi Trường và Phòng Ngừa Dịch Bệnh Thủy Sản Khu Vực Nam Bộ, Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II.

Phương pháp nghiên cứu

Hoạt tính kháng khuẩn

Sử dụng phương pháp giếng khuếch tán để xác định khả năng kháng khuẩn của các chủng *Bacillus* spp. và vi khuẩn lactic dựa theo mô tả của Chythanya và đồng tác giả (2002) và được tóm tắt như sau: trải 50 µl (mật độ 10^8 cfu/ml) dịch vi khuẩn gây bệnh *E. ictaluri* (tăng sinh trong môi trường BHI, 24 giờ, 28°C) lên đĩa thạch BHI (Heart Infusion Broth, India), để khô tự nhiên 15 phút. Hút 50 µl dịch khuẩn khảo sát vào 3 giếng có đường kính 8mm trên đĩa thạch đã trải vi khuẩn gây bệnh. Đo đường kính vòng kháng khuẩn sau 24-48 giờ ủ ở 28°C.

Chuẩn bị thức ăn thí nghiệm

Thức ăn tổng hợp Green Feed của Thái Lan (protein thô 30%, Ca 1,0%-2,5%, P 1,0-1,5%, chất xơ 7%, độ ẩm 11%) được bổ sung các chủng vi khuẩn B3, N26.3, LA61 (đơn chủng) và hỗn hợp 3 chủng trên theo tỉ lệ 1:1:1 (các chủng vi khuẩn đông khô trong skim milk) để đạt mật độ 1×10^7 cfu/g thức ăn. Sau đó thức ăn được áo một lớp dầu mực (5% v/w lượng thức ăn) và để khô tự nhiên khoảng 15 phút và giữ trong tủ lạnh 4°C sử dụng trong vòng 3 ngày. Trước khi sử dụng thức ăn, tiến hành xác định mật độ tế bào sống trong 1g thức ăn. Thức ăn đối chứng sử dụng dầu mực với lượng thể tích tương đương với thức ăn thí nghiệm. Thức ăn trộn với vi khuẩn được sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm và thí nghiệm xác định các thông số miễn dịch tự nhiên.

Thí nghiệm cảm nhiễm

▪ Chuẩn bị dịch vi khuẩn gây bệnh

E. ictaluri Gly09M được ủ trên môi trường BA (Blood agar, India) và bổ sung 5% máu cừu ở 28°C trong 36-48 giờ. Sau đó được nuôi cấy trong hệ thống lên men 5 lít (Bioflow, USA) chứa môi trường lỏng BHI với các thông số lên men như nhiệt độ 28°C, pH 7, sục khí 0,5 vvm, tốc độ khuấy 200 rpm, thời gian lên men 24 giờ. Sau đó dựa vào đường chuẩn đã dựng sẵn ($Y = 8 \times 10^8 \times X - 6 \times 10^6$, $R^2 = 0,99$, X: giá trị OD, Y: mật độ vi khuẩn cfu/ml) để xác định mật độ vi khuẩn trong dung dịch gốc.

▪ Phương pháp xác định LD₅₀

Xác định mật độ vi khuẩn *E. ictaluri* Gly09M gây chết 50% (LD₅₀) cá tra giống dựa trên phương pháp của Reed and Muench (1938). Cá tra giống (18,5g/con) được thuần trong bể composite 20m³ trong 2-4 tuần, sau đó chuyển 15 con vào bể kính 150 lít và thuần thêm 2 tuần, mỗi nghiệm thức lập lại 3 lần. Khảo sát LD₅₀ bằng phương pháp ngâm với mật độ *E. ictaluri* Gly09M: 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 cfu/ml và nghiệm thức đối chứng bổ sung BHI. Theo dõi cá chết hàng ngày cho đến khi cá ngưng chết trong 3 ngày liên tục. Từ đó xác định liều gây chết gấp 2xLD₅₀ cho thí nghiệm cảm nhiễm (Newaj-Fyzul et al., 2007). Khoảng cách tỉ lệ (proportionate distance, PD) giữa hai nồng độ có tỉ lệ chết lớn hơn 50% và nhỏ hơn 50% được tính theo công thức sau:

$$PD = \frac{\text{Tỷ lệ chết } >50\% - 50\%}{\text{Tỷ lệ chết } >50\% - \text{Tỷ lệ chết } <50\%}$$

Vậy LD₅₀ của vi khuẩn này đối với cá là: $LD_{50} = 10^{n-PD}$ cfu/ml, trong đó n: số mũ thấp nhất của vi khuẩn gây chết trên 50%.

▪ Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm cảm nhiễm tiến hành trong bể kính 150 lít (thể tích 100 lít/bể), mỗi bể chứa 15 con/bể (cá có trọng lượng trung bình 20,5 g/con), mỗi nghiệm thức lập lại 3 lần. Thí nghiệm bao gồm 6 nghiệm thức: nghiệm thức đối chứng dương và âm (thức ăn không bổ sung vi khuẩn), 4 nghiệm thức còn lại bổ sung các chủng vi khuẩn khảo sát. Cá tra sau khi cho ăn trong 4 tuần, nghiệm thức đối chứng dương và nghiệm thức có thức ăn bổ sung vi khuẩn được gây nhiễm với *E. ictaluri* Gly09M (mật độ gấp 2xLD₅₀) bằng phương pháp ngâm và nghiệm thức đối chứng âm ngâm với môi trường BHI. Trong suốt quá trình cảm nhiễm, không thay nước, và cá được cho ăn bằng thức ăn thí nghiệm. Hàng ngày đếm số lượng cá chết trong mỗi

bể và thu mẫu cá vừa chết kiểm tra vi khuẩn gây bệnh trong thận bằng cách trải trên môi trường thạch máu có bổ sung 5% máu cừu, sau đó định dạng bằng bộ kit API20E (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) và phần mềm APIWEB™ để xác định vi khuẩn gây bệnh. Thí nghiệm kết thúc khi cá trong các nghiệm thức không chết trong vòng 3 ngày liên tục. Xác định tỉ lệ sống tương đối RPS (relative percentage of survival) theo công thức sau:
$$RPS = [1 - (\text{số cá chết ở nghiệm thức cho ăn thức ăn thí nghiệm} / \text{số cá chết ở nghiệm thức cho ăn thức ăn đối chứng})] \times 100$$

Thí nghiệm miễn dịch

Thí nghiệm bao gồm 5 nghiệm thức trong đó 01 nghiệm thức đối chứng (thức ăn không bổ sung vi khuẩn), 4 nghiệm thức bổ sung vi khuẩn với mật độ 1×10^7 cfu/g. Mỗi nghiệm thức có 3 bể, mỗi bể có 15 con/bể. Mẫu cá được thu ngẫu nhiên mỗi bể 1 con và mỗi nghiệm thức thu 3 con (tương ứng với 3 lần lặp lại) tại thời điểm ban đầu và sau 4 tuần để lấy máu thu huyết thanh dùng cho phân tích hoạt tính lysozyme (lysozyme activity) và tế bào bạch cầu được phân lập từ thận trước (head kidney) dùng để phân tích các chỉ tiêu như khả năng hoạt động thực bào (phagocytic activity), chỉ số thực bào (phagocytic index), hoạt động sản sinh oxy hoạt hóa (superoxide anion production). Tất cả các thí nghiệm, cá được cho ăn theo tỉ lệ 3% trọng lượng thân, cho ăn 2 lần/ngày. Sục khí liên tục, nước tuần hoàn và thay nước 30%/tuần.

Thu mẫu máu và huyết thanh

Thu mẫu máu cá ở thời điểm trước khi bố trí thí nghiệm và sau 4 tuần cho ăn thức ăn trộn với vi khuẩn, mỗi nghiệm thức bắt ngẫu nhiên 3 con cá từ 3 bể của mỗi nghiệm thức. Tiến hành gây mê cá trước khi lấy máu ở động mạch chủ đuôi của cá bằng ống tiêm 1ml vô trùng. Mẫu máu được giữ ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, sau đó ly tâm $4000 \times g$ trong 5 phút ở $4^\circ C$. Huyết thanh được giữ lạnh ở $-80^\circ C$ cho đến khi tiến hành đo các thông số miễn dịch (Yeh et al., 2008).

Thu nhận bạch cầu từ thận trước của cá

Quá trình thu mẫu và phân lập đại thực bào từ thận trước của cá dựa theo phương pháp của Yeh và đồng tác giả (2008). Thận trước được rửa với 1ml L-15 (L1518, Sigma). Sau đó thận trước được nghiền và lọc qua lưới có mắt lưới 100 μm và cho thêm 3ml môi trường L-15. Dịch thận trước được nhỏ nhẹ nhàng vào ống falcon 15ml đã chuẩn bị gradient tỉ trọng 37/51% Percoll (P4937, Sigma), sau đó ống falcon 15 ml được ly tâm $400 \times g$, trong 30 phút ở $4^\circ C$. Tế bào bạch cầu được thu từ lớp xen kẽ hai lớp 37/51% Percoll và rửa hai lần với L-15, sau đó ly tâm $400 \times g$, trong 10 phút ở $4^\circ C$. Các tế bào bạch cầu được pha loãng về mật độ 2×10^6 tế bào/ml trong môi trường L-15 để đánh giá các thông số miễn dịch như hoạt động thực bào và sản sinh oxy hoạt hóa.

Hoạt động thực bào

Hoạt động thực bào được xác định dựa vào phương pháp mô tả bởi Yeh và đồng tác giả (2008). Tiến hành lấy dịch bạch cầu (thu từ thận trước đã pha loãng mật độ về 2×10^6 tế bào/ml trong môi trường L-15) cho vào microplate 12 giếng (500 μl /giếng) được đặt vào đĩa vô trùng ủ 60 phút ở $28^\circ C$ trong một buồng ẩm. Rửa giếng 2 lần với dung dịch L-15 nhằm loại bỏ những tế bào không cố định trên giếng. Sau đó thêm tiếp 500 μl hạt huỳnh quang (2×10^6 tb/ml) dạng huyền phù cho vào những giếng ủ trong tối 2 giờ ở $28^\circ C$, sau đó rửa bỏ hạt huỳnh quang không được thực bào bằng dung dịch PBS. Tiếp tục cho vào 500 μl dung dịch formalin/giếng để cố định tế bào trong tối 30 phút, sau đó tế bào nhuộm màu với propidium iodide (0,1% trong PBS) trong 10 phút ở trong tối. Rửa các giếng bằng PBS lặp lại lần 2 và để khô ở nhiệt độ phòng. Tiến hành đếm số lượng đại thực bào bằng kính hiển vi huỳnh quang (Olympus IX 50, Tokyo, Japan). Hoạt động thực bào được định nghĩa như là số phần trăm tế bào thực bào từ 100 tế bào đếm được và chỉ số thực bào là số lượng trung bình các hạt được thực bào trên mỗi tế bào thực bào (Yeh et al., 2008).

Sản sinh oxy hoạt hóa

Sản sinh oxy hoạt hóa được tạo ra từ tế bào bạch cầu thận trước được phân tích theo phương pháp của Cook và đồng tác giả (2001) và được bổ sung bởi Yeh và đồng tác giả (2008) bằng cách đo sự khử nitroblue tetrazolium (N5514, Sigma) tạo thành formazan như là đo số lượng superoxide sản sinh trong nội bào. Tóm tắt như sau: 100µl dung dịch poly-L-lysine (0,2%, P6282 Sigma) cho vào đĩa 96 giếng để yên từ 60 phút để tăng sự bám dính của tế bào lên bề mặt của giếng. Sau đó các giếng được rửa một lần với 100µl L-15 và cho vào 100µl bạch cầu bạch cầu từ thận trước (2×10^6 tế bào/ml trong môi trường L-15) đem ủ ở nhiệt độ 28°C trong 2 giờ. Sau đó các giếng được rửa 2 lần với L-15 để loại bỏ những tế bào không dính. Các giếng được cho vào 100µl Zymosan (0,1% trong McHBSS, Z4250 Sigma) ủ ở nhiệt độ phòng 30 phút. Zymosan được loại bỏ, sau đó các giếng được rửa 2 lần với 100µl McHBSS, cho vào 100µl nitroblue tetrazolium (0,3%) ủ 30 phút ở nhiệt độ phòng. Phản ứng được ngừng lại bằng cách thêm vào 100µl methanol cồn tuyệt đối và các bạch cầu được rửa 3 lần với 100µl methanol (70%). Các giếng để khô tự nhiên, sau đó thêm vào 120µl KOH và 140µl dimethylsulfoxide (DMSO, D2650 Sigma) trong 2 phút. Sản sinh oxy hoạt hóa được biểu thị bằng lượng giảm cơ chất NBT được đo ở bước sóng 630 nm.

Hoạt tính lysozyme

Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh được đo theo phương pháp của Ellis và đồng tác giả (1990) dựa trên sự phân giải vi khuẩn gram dương *Micrococcus luteus* (M3770, Sigma) của enzyme lysozyme. Tóm tắt như sau: dung dịch chuẩn lysozyme có các nồng độ như sau: nồng độ lysozyme chuẩn từ lòng trắng trứng gà (L4631, Sigma) được pha loãng bậc 2: 16, 8, 4, 2, 0 µg/ml trong dung dịch đệm phosphate PBS 0,05M (pH 6,2). Hút 10µl dịch từ các nồng độ pha loãng cho vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 200µl/giếng dịch huyền phù *Micrococcus luteus* (pha 0,2mg/ml trong dung dịch đệm PBS). Đối với mẫu huyết thanh của cá, hút 10µl cho vào đĩa 96 giếng, thêm 200µl/giếng vi khuẩn *Micrococcus luteus*. Hỗn hợp được ủ ở nhiệt độ 27°C và OD530nm được đo trong 1 phút và 6 phút. Một đơn vị hoạt tính của lysozyme được định nghĩa là số lượng enzym làm giảm độ hấp thu 0,001/phút/ml huyết thanh. Lysozyme được tính dựa vào đường chuẩn lysozyme đã biết nồng độ trước.

Xử lý số liệu

One-way analysis of variance (ANOVA) được sử dụng để phân tích số liệu. Khi bảng ANOVA xác định sự khác biệt có ý nghĩa giữa các nhóm, phép so sánh multiple comparison test (tukey's) được sử dụng để so sánh sự khác biệt có ý nghĩa có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức bằng phần mềm SPSS version 13.0 (SPSS Inc., 1989-2004). Trước khi phân tích, số liệu phần trăm được chuẩn hoá bằng hàm Asin.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả

Hoạt tính kháng khuẩn

Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn của *B. circulans* B3, *Bacillus subtilis* N26.3, *Pediococcus acidilactici* LA61 đối với *E. ictaluri* Gly09M

Chủng vi khuẩn	Vòng vô khuẩn kháng <i>E. ictaluri</i> (mm)*
<i>B. circulans</i> B3	22,5 ± 0,7
<i>Bacillus subtilis</i> N26.3	20,3 ± 0,6
<i>Pediococcus acidilactici</i> LA61	17,7 ± 1,5

(*) số liệu biểu thị trung bình của 3 lần lặp lại

Các chủng vi khuẩn *Bacillus* spp. và *P. acidilactici* LA61 có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh gan thận mù *E. ictaluri* Gly09M, tương ứng với vòng vô khuẩn theo thứ tự 22,5 ± 0,7 mm, 20,3 ± 0,6 mm, 17,7 ± 1,5 mm (Bảng 1).

Xác định liều gây chết LD50

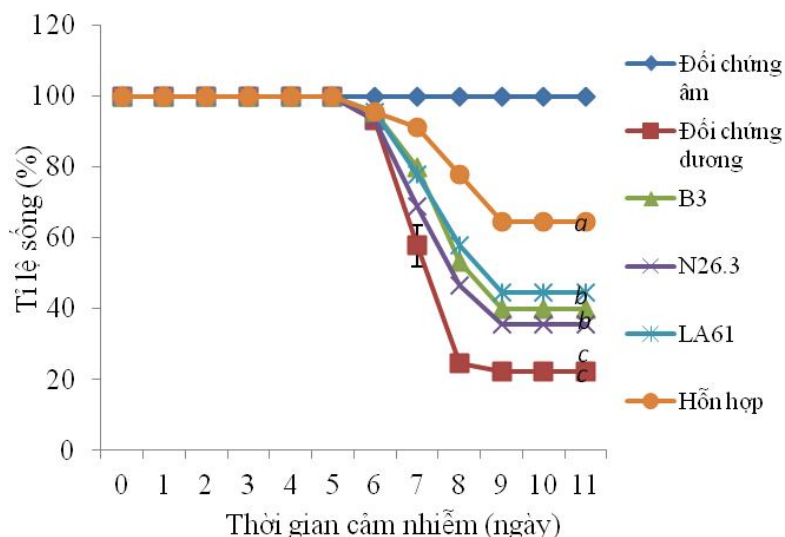
Bảng 2. Kết quả khảo sát LD50 bằng phương pháp ngâm

Mật độ <i>E. ictaluri</i> (cfu/ml)	Tổng số cá (con)	Tổng chết (con)	Tổng sống (con)	Tổng chết đờn (con)	Tổng sống đờn (con)	TL chết đờn (%)
10 ⁵	45	12	33	12	43	21,8
10 ⁶	45	35	10	47	10	82,5
10 ⁷	45	45	0	92	0	100,0
10 ⁸	45	45	0	137	0	100,0
PD = 0,5352446						
LD50 = 2,92×10 ⁵ cfu/ml						

Kết quả khảo sát LD₅₀ bằng phương pháp ngâm cho thấy ở mật độ 2,92×10⁵ cfu/ml *E. ictaluri* gây tỉ lệ chết 50% cho cá tra (trung bình 18,5g/con) (Bảng 2). Do đó liều sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm bằng 2 lần LD₅₀, tức là 5,83×10⁵ cfu/ml *E. ictaluri* Gly09M (Bảng 2).

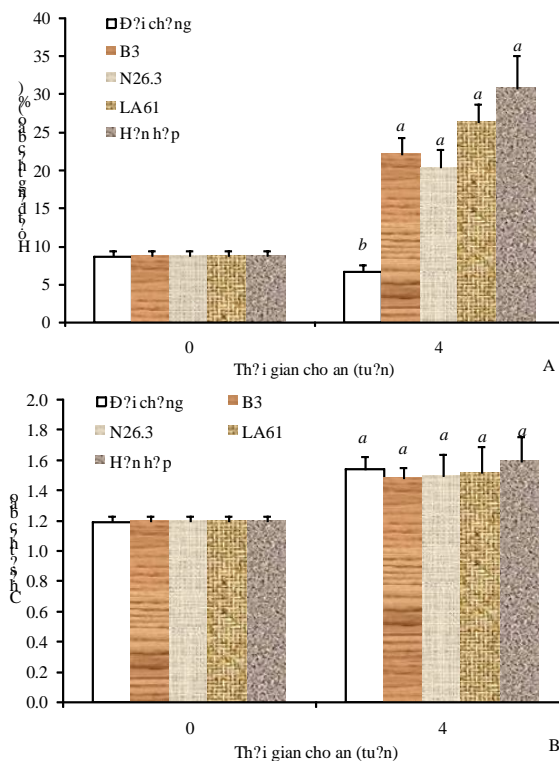
Khả năng bảo vệ cá tra kháng bệnh gan thận mũ

Tất cả cá ở nghiệm thức đối chứng âm (ngâm với môi trường BHI) có tỉ lệ sống 100%. Các nghiệm thức còn lại, cá bắt đầu chết vào ngày thứ 6. Sau 9 ngày cảm nhiễm, tỉ lệ sống của cá ở nghiệm thức LA61 và hỗn hợp cao khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) so với đối chứng, và tăng 22,2% và 42,2% so với đối chứng theo thứ tự. Trong các nghiệm thức trộn vi khuẩn, nghiệm thức hỗn hợp vi khuẩn cho tỉ lệ cao khác biệt có ý nghĩa (p<0,05) so với các nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức bổ sung vi khuẩn đơn lẻ (Hình 1).



Hình 1. Tỉ lệ sống của cá tra sau khi cảm nhiễm với *E. ictaluri* Gly09M, sau khi cho ăn thức ăn bổ sung vi khuẩn B3, N26.3, LA61 và hỗn hợp (mật độ 1×10⁷ cfu/g) sau 4 tuần. Số liệu biểu thị giá trị trung bình và sai số chuẩn (n=3). Các chữ cái khác nhau ở cùng thời điểm biểu thị khác biệt có ý nghĩa (p<0,05).

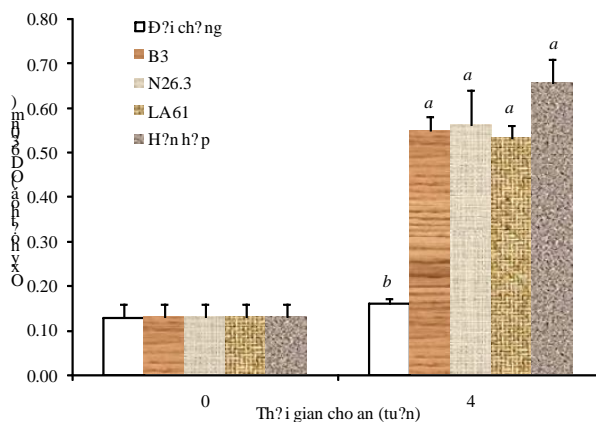
Hoạt động thực bào và chỉ số thực bào



Hình 2. Hoạt động thực bào (A) và chỉ số thực bào (B) của cá tra *P. hypophthalmus* được cho ăn thức ăn đối chứng, B3, N26.3, LA61, và hỗn hợp ở mật độ 1×10^7 cfu/g trong 4 tuần. Số liệu (trung bình \pm SE, n=3) tại cùng thời điểm với chữ cái khác nhau biểu thị khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức.

Hoạt động thực bào (PA) của tế bào bạch cầu của cá tra được cho ăn thức ăn trộn vi khuẩn B3, N26.3, LA61, và hỗn hợp cao khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với đối chứng và tăng gấp 3,3-; 3,1-; 4,0-; và 4,6 lần so với đối chứng theo thứ tự sau 4 tuần cho ăn. Hoạt động thực bào của tế bào bạch cầu của cá tra giữa các nghiệm thức cho ăn thức ăn trộn vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) và trong đó nghiệm thức bổ sung hỗn hợp vi khuẩn có hoạt động thực bào cao nhất. Tuy nhiên chỉ số thực bào (PI) khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) giữa các nghiệm thức (Hình 2).

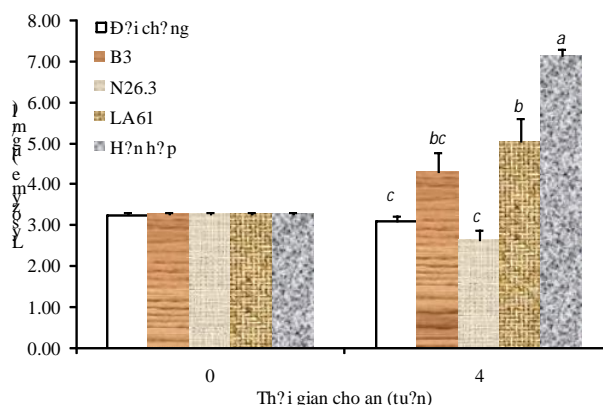
Sản sinh oxy hoạt hoá



Hình 3. Sản sinh oxy hoạt hoá của cá tra *P. hypophthalmus* được cho ăn thức ăn đối chứng, B3, N26.3, LA61, và hỗn hợp ở mật độ 1×10^7 cfu/g trong 4 tuần. Số liệu (trung bình \pm SE, n=3) tại cùng thời điểm với chữ cái khác nhau biểu thị khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức.

Sản sinh oxy hoạt hoá của tế bào bạch của cá tra được cho ăn thức ăn trộn với B3, N26.3, LA61 và hỗn hợp cao khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với đối chứng và tăng gấp 3,4-, 3,5-, 3,3-, và 4,1 lần so với đối chứng, theo thứ tự. Tuy nhiên, sản sinh oxy hoá của cá tra ở các nghiệm thức bổ sung vi khuẩn khác biệt không có ý nghĩa ($p > 0,05$) (Hình 3).

Hoạt tính lysozyme



Hình 4. Hoạt tính lysozyme của cá tra *P. hypophthalmus* được cho ăn thức ăn đối chứng, B3, N26.3, LA61, và hỗn hợp ở mật độ 1×10^7 cfu/g trong 4 tuần. Số liệu (trung bình \pm SE, $n=3$) tại cùng thời điểm với chữ cái khác nhau biểu thị khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) giữa các nghiệm thức.

Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của cá tra được cho ăn thức ăn trộn với LA61 và hỗn hợp tăng cao khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng và tăng 1,6 và 2,3 lần so với đối chứng sau 4 tuần cho ăn, theo thứ tự. Trong đó hoạt tính lysozyme ở nghiệm thức hỗn hợp ($7,14 \pm 0,17$ $\mu\text{g/ml}$) tăng cao khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với nghiệm thức bổ sung LA61 ($5,03 \pm 0,57$ $\mu\text{g/ml}$) (Hình 4).

Thảo luận

Probiotic được sử dụng phổ biến như là tác nhân kiểm soát sinh học trong nuôi trồng thủy sản bởi chúng có những đặc tính ưu việt như tiết ra chất kháng khuẩn và cạnh tranh vị trí bám, kích thích tiêu hoá, tăng trưởng, kích thích hệ miễn dịch tự nhiên (Ringo and Gatesoupe, 1998). Nhiều nghiên cứu chứng minh rằng các *Bacillus* spp. có khả năng tiết ra hợp chất kháng khuẩn thuộc kháng sinh họ peptide, lipopeptide và bacteriocin (Abriouel et al., 2011; Sharma et al., 2006). Aly và đồng tác giả (2008) chỉ ra rằng *B. subtilis* tiết ra hợp chất đối kháng với *A. hydrophila* và *Pseudomonas fluorescens*. Chủng *Bacillus* sp. JB-1 có phổ kháng khuẩn rộng đối với vi khuẩn gây bệnh trên động vật thủy sản như *Streptococcus iniae*, *Lactococcus garvieae*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia ruckeri*, *V. ordalii*, *V. anguillarum* (Brunt et al., 2007). Vi khuẩn lactic acid có thể sản sinh ra các chất như: bacteriocins, nisin, H_2O_2 , acid hữu cơ và các chất này có khả năng ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh (Ringo and Gatesoupe, 1998). Nhiều vi khuẩn lactic (*L. plantarum*, *Carnobacterium* sp., *C. divergens*, và *Lactococcus lactis*) được phân lập từ hệ tiêu hóa của cá, chúng có thể sản sinh ra các hợp chất ức chế nhiều loài vi khuẩn gây bệnh ở *in vivo* hay *in vitro* hoặc cả *in vivo* và *in vitro* như *Aeromonas salmonicida*, *A. hydrophila*, *Pasteurella piscicida*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium psychrophilum*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Streptococcus milleri*, *Vibrio anguillarum*, *V. ordalii*. Vi khuẩn *Pediococcus acidilactici* 13 cũng có khả năng tiết ra bacteriocin và ức chế vi khuẩn gây bệnh *Listeria monocytogenes* trong thực phẩm (Altuntas et al., 2010). Theo nghiên cứu của Castex và đồng tác giả, (2008) sử dụng *Pediococcus acidilactici* (strain MA 18/5M, CNCM) trộn vào thức ăn cho tôm *Litopenaeus stylirostris*, kết quả cho thấy tổng số vi khuẩn gây bệnh *Vibrio* sp. trong hệ tiêu hoá giảm khác biệt có ý nghĩa so với đối chứng. Điều này cũng phù hợp với kết quả của nghiên cứu kiểm tra hoạt tính kháng khuẩn của chủng *Bacillus circulans* B3, *Bacillus subtilis* N26.3, *Pediococcus acidilactici* LA61 đối kháng với vi khuẩn *E. ictaluri*.

Hệ vi sinh vật trong đường ruột của cá phụ thuộc rất lớn vào môi trường nuôi, do vậy probiotic có thể đưa vào vật chủ thông qua cho vào môi trường nước và thức ăn (Salinas et al., 2008). Có rất ít nghiên cứu tác dụng tương hỗ của hỗn hợp probiotic lên vật chủ, sử dụng đơn chủng hay đa chủng, đa loài có thật sự giúp cho vật chủ có khả năng tăng cường sự bảo vệ chống lại sự xâm nhập các vi sinh vật gây bệnh vẫn còn chưa hiểu rõ ràng (Salinas et al., 2005; Timmerman et al., 2004). Các chủng vi khuẩn có các đặc tính probiotic khác nhau nên tác dụng lên vật chủ sẽ khác nhau. Do đó việc tạo sản phẩm probiotic theo hướng sử dụng đa chủng và đa loài nên được khuyến khích (Timmerman et al., 2004) nhằm hỗ trợ cho nhau và tăng cường hiệu quả sử dụng của sản phẩm. Nghiên cứu sử dụng đơn chủng hay hỗn hợp vi khuẩn (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* và *Bacillus subtilis*) ở mật độ 1×10^7 cfu/g cho cá *Sparus aurata* ăn trong 3 tuần, kết quả cho thấy tăng hoạt tính bổ thể, peroxidase, hoạt động thực bào, và tăng hàm lượng IgM trong huyết thanh ở nghiệm thức bổ sung hỗn hợp vi khuẩn (Salinas et al., 2008). Hỗn hợp vi khuẩn lactic (*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* CLFP 100, *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196, và *Lactobacillus sakei* CLFP 202) được bổ sung vào thức ăn ở mật độ 10^6 cfu/g cho cá *Oncorhynchus mykiss* ăn trong 14 ngày, kết quả làm tăng hoạt động thực bào, bổ thể, oxy hoạt hoá (Balcázar et al., 2007). Hỗn hợp vi khuẩn (*B. subtilis*, *L. acidophilus*, *Clostridium butyricum* và *S. cerevisiae*) ở mật độ 10^7 - 10^8 cfu/g dùng làm thức ăn cho cá bơn *Paralichthys olivaceus* (15g) trong 50 ngày, kết quả thu được tăng hoạt tính lysozyme (Taoka et al., 2006). Tương tự trong nghiên cứu này, hỗn hợp vi khuẩn bao gồm *Bacillus* spp. và vi khuẩn lactic *Pediococcus* LA61 được bổ sung vào thức ăn với mật độ 1×10^7 (cfu/g) cho cá tra ăn trong 4 tuần, kết quả thu được hỗn hợp có khả năng kích thích hệ miễn dịch tự nhiên như hoạt động thực bào, sản sinh oxy hoạt hoá và hoạt tính lysozyme tăng cao so với khi sử dụng đơn chủng và đối chứng.

Do vậy, kết luận rằng sản phẩm probiotic bao gồm hỗn hợp các chủng *B. circulans* B3, *B. subtilis* N26.3, *P. acidilactici* LA61 sử dụng ở nồng độ 1×10^7 cfu/g và cho ăn trong 4 tuần có khả năng tăng cường sức đề kháng, kháng bệnh gan thận mũ gây ra bởi *E. ictaluri* trên cá tra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., and Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews* **35**, 201-232.
- Altuntas, E. G., Cosansu, S., and Ayhan, K. (2010). Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13. *International Journal of Food Microbiology* **141**, 28-31.
- Aly, S. M., Abdel-Galil Ahmed, Y., Abdel-Aziz Ghareeb, A., and Mohamed, M. F. (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish & Shellfish Immunology* **25**, 128-136.
- Balcázar, J. L., Blas, I. d., Ruiz-Zarzuola, I., Cunningham, D., Vendrell, D., and Muzquiz, J. L. (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology* **114**, 173-186.
- Balcázar, J. L., De Blas, I., Ruiz-Zarzuola, I., Vendrell, D., Gironés, O., and Muzquiz, J. L. (2007). Enhancement of the immune response and protection induced by probiotic lactic acid bacteria against furunculosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **51**, 185-193.
- Bricknell, I., and Dalmo, R. A. (2005). The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish & Shellfish Immunology* **19**, 457-472.
- Brunt, J., Newaj-Fyzul, A., and Austin, B. (2007). The development of probiotics for the control of multiple bacterial diseases of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* **30**, 573-579.
- Castex, M., Chim, L., Pham, D., Lemaire, P., Wabete, N., Nicolas, J.-L., Schmidely, P., and Mariojouis, C. (2008). Probiotic *P. acidilactici* application in shrimp *Litopenaeus stylirostris* culture subject to vibriosis in New Caledonia. *Aquaculture* **275**, 182-193.

- Crumlish, M., Dung, T. T., Turnbull, J. F., Ngoc, N. T. N., and Ferguson, H. W. (2002). Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases* **25**, 733-736.
- Crumlish, M., Thanh, P. C., Koesling, J., Tung, V. T., and Gravningen, K. (2010). Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Fish Diseases* **33**, 717-722.
- Dung, T. T., Crumlish, M., Ferguson, H. W., Ngoc, N. T. N., Thịnh, N. Q., and Thy, D. T. M. (2003). Xác định vi khuẩn gây bệnh đốm trắng trên gan cá tra nuôi thâm canh ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tuyển tập báo cáo khoa học về nuôi trồng thủy sản, Hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 2, Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I. Nhà xuất bản Nông nghiệp, Trang 411-420.
- Dung, T. T., Haesebrouck, F., Tuan, N. A., Sorgeloos, P., Baele, M., and Decostere, A. (2008). Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Edwardsiella ictaluri* Isolates from Natural Outbreaks of Bacillary Necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Microbial drug resistance* **14**, 311-316.
- Ellis, A. (1988). Fish vaccination. London: Academic Press.
- Ferguson, H. W., Turnbull, J. F., Shinn, A., Thompson, K., Dung, T. T., and Crumlish, M. (2001). Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases* **24**, 509-513.
- Gatesoupe, F. J. (1999). The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* **180**, 147-165.
- Hào, N. V., Sáng, N. V., Khôi, P. Đ., and Hùng, Đ. (2000-2003). Báo cáo tổng kết năm thực hiện đề tài "Nâng cao chất lượng đàn cá bố mẹ thông qua tốc độ tăng trưởng bằng phương pháp chọn lọc cá thể".
- Irianto, A., and Austin, B. (2002). Probiotics in aquaculture. *Journal of Fish Diseases* **25**, 633-642.
- Loan, L. T. T., Phụng, V. H., Huyền, N. T., Thành, T. P., Sơn, Đ. T., and Mai, T. T. T. (2007). Khảo sát vòng đời của *Achlya* sp. gây bệnh nấm thủy mi trên trứng cá tra và basa. *Tuyển tập nghề cá Sông Cửu Long - NXB Nông Nghiệp*, Trang: 181-188.
- Newaj-Fyzul, A., Adesiyun, A. A., Mutani, A., Ramsubhag, A., Brunt, J., and Austin, B. (2007). *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1699-1706.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., and Endo, M. (2006). Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* **113**, 339-347.
- Ran, C., Carrias, A., Williams, M. A., Capps, N., Dan, B. C. T., Newton, J. C., Klopper, J. W., Ooi, E. L., Browdy, C. L., Terhune, J. S., and Lile, M. R. (2012). Identification of *Bacillus* Strains for Biological Control of Catfish Pathogens. *PLoS ONE* **7**, e45793.
- Reed, L. J., and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Epidemiology* **27**, 493-497.
- Ringo, E., and Gatesoupe, F.-J. (1998). Lactic acid bacteria in fish: a review. *Aquaculture* **160**, 177-203.
- Robertson, P. A. W., O'Dowd, C., Burrells, C., Williams, P., and Austin, B. (2000). Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Aquaculture* **185**, 235-243.
- Sakai, M. (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture* **172**, 63-92.
- Salinas, I., Abelli, L., Bertoni, F., Picchiatti, S., Roque, A., Furones, D., Cuesta, A., Meseguer, J., and Esteban, M. Á. (2008). Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* **25**, 114-123.

- Salinas, I., Cuesta, A., Esteban, M. A., and Meseguer, J. (2005). Dietary administration of *Lactobacillus delbrückii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology* **19**, 67-77.
- Sharma, N., Kapoor, G., and Neopaney, B. (2006). Characterization of a new bacteriocin produced from a novel isolated strain of *Bacillus lentus* NG121 *Antonie van Leeuwenhoek* **89**, 337-343.
- Shelby, R. A., Lim, C., Yildirim-Aksoy, M., and Klesius, P. H. (2007). Effects of probiotic bacteria as dietary supplements on growth and disease resistance in young Channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). *Journal of Applied Aquaculture* **19**, 81-91.
- Subagja, J., Slembrouck, J., Hung, L. T., and Legendre, M. (1999). Larval rearing of an Asian catfish *Pangasius hypophthalmus* (Siluroidei Pangasiidae): analysis of precocious mortality and proposition of appropriate treatments. *Aquatic Living Resources* **12**, 37-44.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.-Y., Jeon, M.-J., Bai, S. C., Lee, W.-J., Yuge, K., and Koshio, S. (2006). Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fisheries Science* **72**, 310-321.
- Thịnh, N. H., and Loan, T. T. (2007). Phân lập và khảo sát đặc điểm kháng kháng sinh của *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mũ trên cá tra, *Pangasianodon hypophthalmus*, nuôi thâm canh. *Tạp chí KHKT Nông Lâm nghiệp* **1&2**, 175-179.
- Timmerman, H. M., Koning, C. J. M., Mulder, L., Rombouts, F. M., and Beynen, A. C. (2004). Monostrain, multistain and multispecies probiotics-A comparison of functionality and efficacy. *International Journal of Food Microbiology* **96**, 219-233.
- Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P., and Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**, 655-671.
- Vine, N. G., Leukes, W. D., and Kaiser, H. (2006). Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiology Reviews* **30**, 404-427.