

# ẢNH HƯỞNG CỦA VI KHUẨN *LYSINIBACILLUS MACROIDES* ĐẾN ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH DO *STREPTOCOCCUS INIAE* CỦA CÁ CHỀM (*LATES CALCARIFER*)

Trương Thị Hoa<sup>\*</sup>, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Trần Nam Hà

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

## TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của vi khuẩn *Lysinibacillus macroides* đến đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng bệnh do *Streptococcus iniae* của cá chẽm (*Lates calcarifer*). Thí nghiệm được bố trí với 4 nghiệm thức và 3 lần lặp lại. Cá được cho ăn thức ăn trộn với *Lysinibacillus macroides* trong 30 ngày. Các mẫu máu được lấy vào ngày 1; 15 và 30 để phân tích huyết học, khả năng ức chế vi khuẩn của huyết thanh và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh. Kết quả nghiên cứu xác định chủng vi khuẩn *L. macroides* CH1 có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *S. iniae*. Kết quả thí nghiệm bổ sung chủng vi khuẩn *L. macroides* CH1 vào thức ăn cho cá chẽm ăn trong 30 ngày cho thấy số lượng tế bào hồng cầu và tổng bạch cầu, khả năng ức chế vi khuẩn của huyết thanh và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của cá cao hơn so với các nghiệm thức khác ( $p < 0,05$ ). Tỷ lệ sống sau 15 ngày cảm nhiễm *S. iniae* ở nghiệm thức bổ sung *L. macroides* vào thức ăn (64,3%) cao hơn so với đối chứng (35,7%) ( $p < 0,05$ ).

*Từ khóa:* Cá chẽm, đáp ứng miễn dịch, *Lysinibacillus macroides*, *Streptococcus iniae*.

## MỞ ĐẦU

Cá chẽm là một trong những đối tượng nuôi có giá trị kinh tế cao, hơn nữa nhu cầu tiêu thụ cá chẽm ngày càng tăng trong những năm gần đây là điều kiện thích hợp để người dân mở rộng diện tích nuôi cá chẽm. Tuy nhiên, cá chẽm lại là loài rất mẫn cảm với nhiều loại bệnh do ký sinh trùng, virus đặc biệt là các bệnh do vi khuẩn (Anderson *et al.*, 1996). Theo Wendover (2010), bệnh do vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chẽm khá phổ biến. Trên cá chẽm, bệnh do *S. iniae* được báo cáo lần đầu tiên vào năm 1999 tại Úc (Bromage *et al.*, 1999), sau đó bệnh tiếp tục xuất hiện trên cá chẽm nuôi tại Úc năm 2006 (Creper, Buller, 2006), tại Thái Lan năm 2010 (Suanyuk *et al.*, 2010). Bệnh do *S. iniae* trên cá chẽm gây xuất huyết trên da, vẩy và mắt lồi đục (Bromage *et al.*, 1999). Một số dấu hiệu khác như lở loét ngoài da hay xuất huyết ở các gốc vây, nắp mang, hậu môn đã được quan sát trên cá chẽm và cá rô phi nhiễm *S. iniae* (Suanyuk *et al.*, 2010). Bệnh do *S. iniae* có thể gây ra tỷ lệ chết lên đến 70% ở giai đoạn cá chẽm giống (Creper, Buller, 2006). Ở Việt Nam, bệnh do *S. iniae* được báo cáo xuất hiện đầu tiên trên cá chẽm nuôi tại Khánh Hòa vào năm 2013 (Hich *et al.*, 2013), ở Thừa Thiên Huế năm 2018 (Hoa *et al.*, 2018). Do vậy, bên cạnh việc phát triển, gia tăng sản lượng nuôi cá chẽm thì việc đảm bảo sức khỏe và hạn chế mầm bệnh xuất hiện và gây bệnh trên cá chẽm là điều cần thiết phải tiến hành.

*Bacillus* là một trong những loài vi khuẩn có mặt ở khắp các môi trường khác nhau, trong đó có cả thủy vực nước mặn, lợ (Nithya *et al.*, 2010). Rất nhiều chủng vi khuẩn trong *Bacillus* được biết là lợi khuẩn và an toàn cho con người trong quá trình sử dụng như một số có mặt trong sản phẩm lên men hay các loại thực phẩm chức năng hoặc các loại chế phẩm sinh học (Bacon and Hinton 2002). Một số nghiên cứu chỉ ra rằng, *Bacillus* có khả năng điều khiển quá trình sinh học đối với một số chủng vi khuẩn khác, do đó *Bacillus* trở thành một trong những nguồn nguyên liệu quan trọng để tạo ra chế phẩm sinh học (Donio *et al.*, 2014). Do vậy, để ức chế vi khuẩn gây bệnh và nâng cao sức đề kháng cho cá, một số chủng vi khuẩn đã được bổ sung vào khẩu phần ăn để kích thích tăng trưởng, kích thích gia tăng hoạt động của hệ miễn dịch kháng lại một số vi khuẩn gây bệnh trên cá. Từ đó, nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của vi khuẩn *Lysinibacillus macroides* lên miễn dịch và khả năng kháng bệnh do *Streptococcus iniae* của cá chẽm, làm cơ sở cho việc đề xuất biện pháp phòng bệnh trên cá chẽm.

## NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Streptococcus iniae* HTA3 và *Lysinibacillus macroides* CH1, DH7 và CH21 được cung cấp từ bộ sưu tập mẫu vi khuẩn của phòng thí nghiệm của Bộ môn Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Vi khuẩn *Streptococcus iniae* được nuôi trên môi trường Tryptone Soya Broth bổ sung 2% NaCl (TSB+) và ủ trong 24 giờ ở 28°C. Vi khuẩn *L. macroides* được nuôi trên môi trường *De Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) trong 24 giờ ở 28°C.

Cá chêm giống được cung cấp từ Trại giống Thủy sản Vân Nam, tỉnh Thừa Thiên Huế. Số lượng cá bố trí thí nghiệm là 240 con, cá có chiều dài từ 6 - 7 cm và khối lượng 5,5 - 8,2 g/con, cá chêm được thả vào 12 bể nhựa có thể tích 80 L, mỗi bể thả 20 con. Cá được nuôi trong hệ thống bể thí nghiệm 5 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Cá được cho ăn bằng thức ăn Nanolis C (Ocialis, Việt Nam), cho ăn 2 lần/ngày vào lúc 8 giờ và 17 giờ, mỗi lần cho ăn 8% khối lượng thân.

#### **Xác định khả năng đối kháng với vi khuẩn *S. iniae* của vi khuẩn *L. macroides***

Xác định tính đối kháng với vi khuẩn *S. iniae* của vi khuẩn *L. macroides* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch (Sivakumar *et al.*, 2012). Vi khuẩn *S. iniae* được nuôi sinh khối trong môi trường TSB+ trong 24 giờ ở 28°C. Tiến hành ly tâm 4000 vòng/phút trong 20 phút, xác định mật độ vi khuẩn cần thử nghiệm là 10<sup>6</sup> CFU/mL, lấy 50 µL mẫu trải đều trên môi trường Tryptic Soy Agar có bổ sung thêm 2% NaCl (TSA+) đã tạo 4 giếng trên môi trường bằng đầu tít vô trùng, để khô trong 15 phút. Chủng vi khuẩn *L. macroides* được nuôi trong môi trường MRS ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ; tiến hành ly tâm 4000 vòng/phút trong 20 phút, xác định mật độ vi khuẩn cần thử nghiệm là 10<sup>9</sup> CFU/mL, lấy 50 µL cho vào mỗi giếng trên môi trường TSA+ đã trải đều vi khuẩn *S. iniae*, nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Hoạt động kháng khuẩn của chủng vi khuẩn *L. macroides* được xác định dựa vào đường kính vòng kháng khuẩn xung quanh các giếng. Mức độ kháng vi khuẩn *S. iniae* của *L. macroides* được đánh giá dựa trên đường kính của vòng vô trùng (Sivakumar *et al.*, 2012). Theo Sivakumar *et al.* (2012), khả năng kháng *S. iniae* của vi khuẩn *L. macroides* được xác định qua đường kính (d) vòng kháng khuẩn và được quy định như sau: (+): kháng yếu, d < 12 mm; (++) : kháng trung bình, 12 ≤ d ≤ 15 mm; (+++): kháng mạnh, d > 15 mm.

Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn *L. macroides*: Qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *L. macroides* với thành phần hóa chất tham gia phản ứng và điều kiện chu kỳ nhiệt được thực hiện theo phương pháp của Walter và đồng tác giả (2001), sử dụng cặp mồi đặc hiệu dùng để phát hiện 16S rRNA gene của tất cả các chủng *Lactobacillus* với mồi xuôi LacF: AGCAGTAGGGAATCTTCCA và mồi ngược LacR: CCGCGATTACTAGCGATTCCG, sản phẩm khuếch đại có kích thước là 1006 bp.

#### **Phương pháp xác định khả năng đề kháng với *S. iniae* của cá chêm cho ăn thức ăn bổ sung vi khuẩn *L. macroides***

Cá chêm cho ăn thức ăn bổ sung vi khuẩn *L. macroides* mật độ 10<sup>9</sup> CFU/mL, sau 15 ngày được cảm nhiễm với vi khuẩn *S. iniae* bằng phương pháp tiêm vào xoang bụng (Hoa *et al.*, 2018), nồng độ vi khuẩn cảm nhiễm thông qua thí nghiệm xác định giá trị LD50 của *S. iniae* 1,9x10<sup>5</sup> CFU/cá. Cụ thể, thí nghiệm được bố trí với 04 nghiệm thức và 03 lần lặp lại. Nghiệm thức 1 (NT 1): Không bổ sung vi khuẩn *L. macroides* vào thức ăn và không cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*; Nghiệm thức 2 (NT 2): Không bổ sung vi khuẩn *L. macroides* vào thức ăn và cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae* ở thời điểm 15 ngày thí nghiệm. Nghiệm thức 3 (NT 3): Bổ sung vi khuẩn *L. macroides* vào thức ăn và không cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*; Nghiệm thức 4 (NT 4): Bổ sung vi khuẩn *L. macroides* vào thức ăn và cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae* thời điểm 15 ngày thí nghiệm.

Theo dõi thí nghiệm trong 30 ngày, trong quá trình thí nghiệm, một số yếu tố môi trường được duy trì ở mức thích hợp cho cá phát triển. Tiến hành lấy máu ở động mạch đuôi cá vào ngày thí nghiệm 1; 15 và 30 ở các nghiệm thức (mỗi lần thu mẫu lấy 02 con/bể) để xác định số lượng tế bào máu, khả năng ức chế *S. iniae* của huyết thanh và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh.

Xác định số lượng tế bào hồng cầu và tổng bạch cầu trong máu của cá được xác định theo phương pháp của Chinabut và đồng tác giả (1991), mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và số lượng tổng bạch cầu trong máu cá được xác định bằng cách nhuộm với dung dịch Wright và Giemsa. Khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh cá chêm được xác định theo phương pháp của Crosbie và Nowak (2004). Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá chêm được xác định theo phương pháp của Kumar và đồng tác giả (2007).

Tỷ lệ sống của tôm được xác định sau 15 ngày cảm nhiễm *S. iniae* theo công thức: Tỷ lệ sống (%) = (Số cá sống sau khi cảm nhiễm *S. iniae*/ Số cá cảm nhiễm *S. iniae*) × 100.

#### **Xử lý số liệu**

Các số liệu được nhập và xử lý bằng phần mềm Excel. So sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức thông qua phân tích phương sai (ANOVA) 1 nhân tố với phép thử Duncan ở mức ý nghĩa (p < 0,05) bằng phần mềm SPSS 20.0.

## **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **Khả năng đối kháng với vi khuẩn *S. iniae* của các chủng vi khuẩn *L. macroides***

Kết quả xác định khả năng đối kháng với vi khuẩn *S. iniae* HTA3 của các chủng vi khuẩn *L. macroides* CH1, DH7 và CH21 cho thấy cả ba chủng vi khuẩn *L. macroides* đều có khả năng kháng với *S. iniae*, trong đó chủng *L. macroides* CH1 có khả năng đối kháng mạnh với vi khuẩn *S. iniae* với đường kính vòng kháng khuẩn trung bình là 16,3 mm, cao hơn có ý nghĩa thống kê với hai chủng còn lại (Bảng 1).

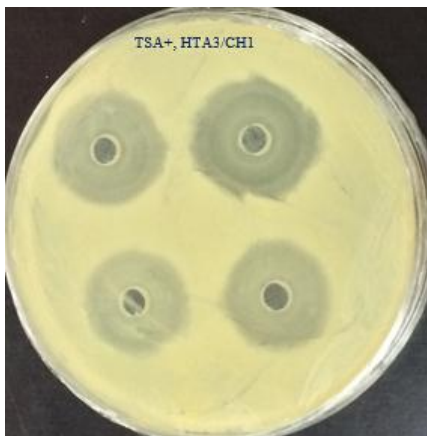
**Bảng 1. Kết quả xác định khả năng đối kháng với vi khuẩn *S. iniae* HTA3 của các chủng vi khuẩn *L. macroides***

Chủng vi khuẩn	Đường kính vòng kháng khuẩn TB ± SD (mm)	Khả năng kháng với vi khuẩn <i>S. iniae</i>
<i>L. macroides</i> CH1	16,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	+++
<i>L. macroides</i> DH7	14,4 ± 1,5 <sup>b</sup>	++
<i>L. macroides</i> CH21	14,1 ± 1,3 <sup>b</sup>	++

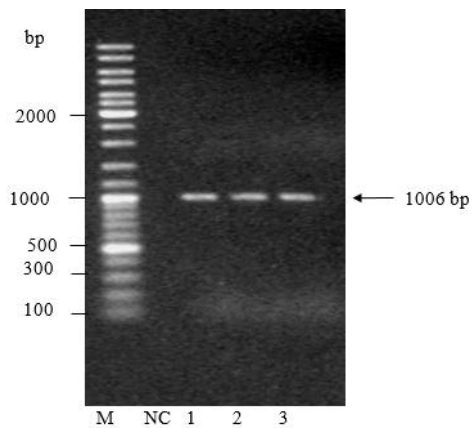
Ghi chú: (++) : kháng trung bình, 12 ≤ d ≤ 15 mm; (+++) : kháng mạnh, d > 15 mm.

Các giá trị trong cùng cột có các chữ cái a, b khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Kết quả định danh *L. macroides* bằng phương pháp PCR cho thấy kết quả điện di sản phẩm PCR của đoạn gen 16S rRNA tách chiết từ 03 chủng *L. macroides* CH1, DH7 và CH21 ghi nhận vạch 1006 bp đặc hiệu cho *L. macroides* (Hình 2). Sau khi tiến hành giải trình tự gene chúng tôi đối chiếu với kết quả của Walter và đồng tác giả (2001) thì các chủng vi khuẩn này là *L. macroides*. Từ kết quả xác định khả năng đối kháng với vi khuẩn *S. iniae* HTA3 của các chủng vi khuẩn *L. macroides*, chúng tôi chọn chủng *L. macroides* CH1 đưa vào bố trí thí nghiệm bổ sung vào thức ăn cho cá chêm.



**Hình 1. Hình ảnh vòng kháng khuẩn của *S. iniae* HTA3 với *L. macroides* CH1, thể hiện khả năng đối kháng với *S. iniae* HTA3 của với vi khuẩn *L. macroides* CH1**



**Hình 2. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 2% (M: Thang 1 kb (GeneRuler™ DNA); NC: đối chứng âm; giếng 1, 2, và 3: lần lượt là sản phẩm khuếch đại DNA của chủng vi khuẩn *L. macroides* CH1, DH7 và CH21)**

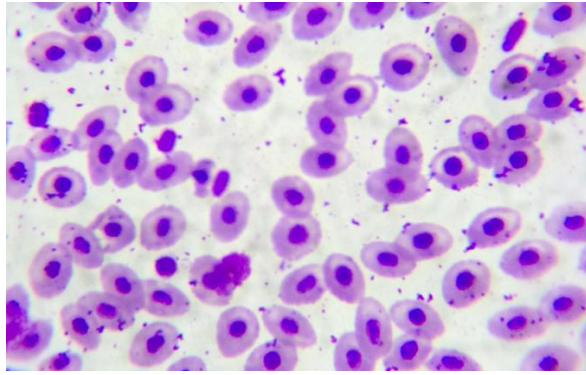
### Số lượng tế bào hồng cầu và tổng bạch cầu trong máu cá chêm

Kết quả xác định số lượng tế bào hồng cầu trong máu cá chêm cho thấy ở ngày thứ 15 (trước khi gây cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*), số lượng hồng cầu ở NT 3 và NT 4 (có bổ sung *L. macroides* vào thức ăn) cao hơn có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với NT 1 và NT 2 (không bổ sung *L. macroides* vào thức ăn). Sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*, số lượng hồng cầu ở NT 2 và NT 4 giảm, trong đó ở NT 2 (cảm nhiễm *S. iniae* và không bổ sung vi khuẩn *L. macroides* vào thức ăn) số lượng hồng cầu thấp hơn có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với NT 4 (cảm nhiễm *S. iniae* và bổ sung *L. macroides* vào thức ăn). Tương tự số lượng tổng bạch cầu ở NT 2 và NT 4 tăng sau khi cảm nhiễm *S. iniae*. Như vậy, bên cạnh sự suy giảm số lượng hồng cầu ở NT 2 và NT 4 sau khi cảm nhiễm *S. iniae*, số lượng tổng bạch cầu tăng ở 2 nghiệm thức này (Bảng 2). Như vậy có thể thấy rằng việc bổ sung vi khuẩn *L. macroides* vào thức ăn đã kích hoạt số lượng bạch cầu tăng lên, giúp bảo vệ cơ thể cá chống lại sự xâm nhiễm của vi khuẩn *S. iniae*.

**Bảng 2. Biến động số lượng tế bào hồng cầu và tổng bạch cầu trong máu cá chêm**

Nghiệm thức	Số lượng tế bào hồng cầu (x10 <sup>6</sup> tế bào/mL) (TB±SD)			Số lượng tổng bạch cầu (x10 <sup>5</sup> tế bào/mL) (TB±SD)		
	1 ngày	15 ngày	30 ngày	1 ngày	15 ngày	30 ngày
NT 1	2,32 ± 0,21 <sup>a</sup>	2,54 ± 0,25 <sup>a</sup>	3,77 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,32 ± 0,24 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,74 <sup>a</sup>	2,97 ± 0,30 <sup>a</sup>
NT 2	2,38 ± 0,25 <sup>a</sup>	2,81 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,67 ± 0,17 <sup>b</sup>	2,31 ± 0,33 <sup>a</sup>	2,49 ± 0,27 <sup>a</sup>	3,87 ± 0,31 <sup>b</sup>
NT 3	2,31 ± 0,31 <sup>a</sup>	3,60 ± 0,30 <sup>b</sup>	4,52 ± 0,27 <sup>c</sup>	2,27 ± 0,42 <sup>a</sup>	2,46 ± 0,25 <sup>a</sup>	4,05 ± 0,54 <sup>b</sup>
NT 4	2,43 ± 0,23 <sup>a</sup>	3,75 ± 0,27 <sup>b</sup>	3,13 ± 0,58 <sup>ac</sup>	2,39 ± 0,78 <sup>a</sup>	3,31 ± 0,06 <sup>b</sup>	4,14 ± 0,16 <sup>b</sup>

Ghi chú: Các giá trị trong cùng cột có các chữ cái a, b, c, d khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).



Hình 3. Hình thái tế bào máu cá chêm (X100)

Theo Sampath và đồng tác giả (1998), các thông số huyết học của cá nói chung và số lượng hồng cầu nói riêng được sử dụng làm tiêu chí đánh giá tình trạng sức khỏe của cá. Số lượng hồng cầu trong máu cá biến động do nhiều nguyên nhân, trong đó khi cơ thể cá nhiễm mầm bệnh vi khuẩn, số lượng hồng cầu giảm do bị vi khuẩn phá hủy (Martins *et al.*, 2008). Trong khi đó, bạch cầu là thành phần cơ bản của hệ thống miễn dịch, với chức năng bảo vệ cơ thể, bạch cầu có vai trò thực bào và đáp ứng miễn dịch chống lại mầm bệnh xâm nhập và các nhân tố bất lợi khác (Zinkl *et al.*, 1991). Do đó, kết quả thí nghiệm này cho thấy ở NT 2 và NT 4, sau khi cảm nhiễm *S. iniae*, số lượng tổng bạch cầu tăng.

**Khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh**

Kết quả nghiên cứu khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh cho thấy tỷ lệ (%) vi khuẩn *S. iniae* bị ức chế bởi huyết thanh cá chêm ở các nghiệm thức tăng trong 30 ngày thí nghiệm. Khi bổ sung *L. macroides* vào thức ăn cho cá chêm và cảm nhiễm *S. iniae*, khả năng ức chế *S. iniae* của huyết thanh cao hơn so với các nghiệm thức khác.

Bảng 3. Khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh cá chêm

Nghiệm thức	Khả năng ức chế vi khuẩn <i>S. iniae</i> của huyết thanh (%); (TB±SD)		
	1 ngày	15 ngày	30 ngày
NT 1	21,3 ± 2,3 <sup>a</sup>	27,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	35,7 ± 4,0 <sup>a</sup>
NT 2	23,7 ± 4,0 <sup>a</sup>	30,3 ± 5,0 <sup>a</sup>	45,0 ± 3,6 <sup>b</sup>
NT 3	27,0 ± 3,0 <sup>a</sup>	32,7 ± 7,5 <sup>a</sup>	57,3 ± 1,52 <sup>c</sup>
NT 4	25,3 ± 3,21 <sup>a</sup>	34,7 ± 4,2 <sup>a</sup>	61,3 ± 1,2 <sup>c</sup>

Ghi chú: Các giá trị trong cùng cột có các chữ cái a, b, c, d khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

**Hoạt tính của lysozyme trong huyết thanh**

Kết quả xác định hoạt tính lysozyme của huyết thanh cá chêm cho thấy ở NT 3 và NT 4 (có bổ sung *L. macroides* vào thức ăn) ở thời điểm 15 ngày thí nghiệm, hoạt tính lysozyme cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với NT 1 và NT 2. Ở thời điểm 30 ngày thí nghiệm, hoạt tính lysozyme ở NT 2 (không bổ sung vi khuẩn *L. macroides* vào thức ăn và cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*) thấp hơn nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với NT 4 (bổ sung vi khuẩn *L. macroides* vào thức ăn và cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*) (Bảng 4). Tương tự với nghiên cứu của Kumar và đồng tác giả (2007) và Trinh và đồng tác giả (2017) cho thấy lysozyme đóng một vai trò quan trọng trong đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của cá và có khả năng kích thích hệ miễn dịch của cá chống lại các tác nhân vi khuẩn gây bệnh.

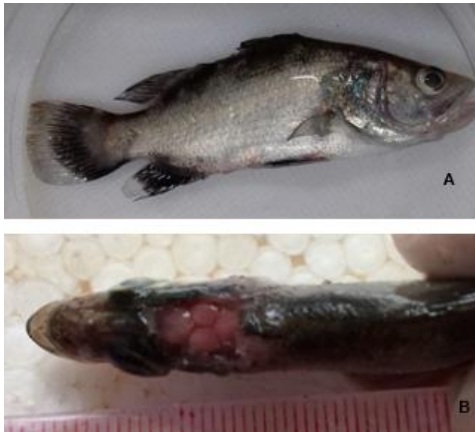
Bảng 4. Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá chêm

Nghiệm thức	Hoạt tính của lysozyme trong huyết thanh cá chêm (U/phút/mg), (TB±SD)		
	1 ngày	15 ngày	30 ngày
NT 1	691,9 ± 22,3 <sup>a</sup>	775,9 ± 24,8 <sup>a</sup>	817,1 ± 35,9 <sup>a</sup>
NT 2	724,8 ± 13,2 <sup>a</sup>	858,8 ± 33,7 <sup>b</sup>	1063,3 ± 106,5 <sup>b</sup>
NT 3	751,6 ± 21,4 <sup>a</sup>	913,0 ± 69,4 <sup>bc</sup>	1137,7 ± 27,04 <sup>b</sup>
NT 4	761,6 ± 60,7 <sup>a</sup>	1008,1 ± 62,3 <sup>d</sup>	1043,8 ± 75,4 <sup>b</sup>

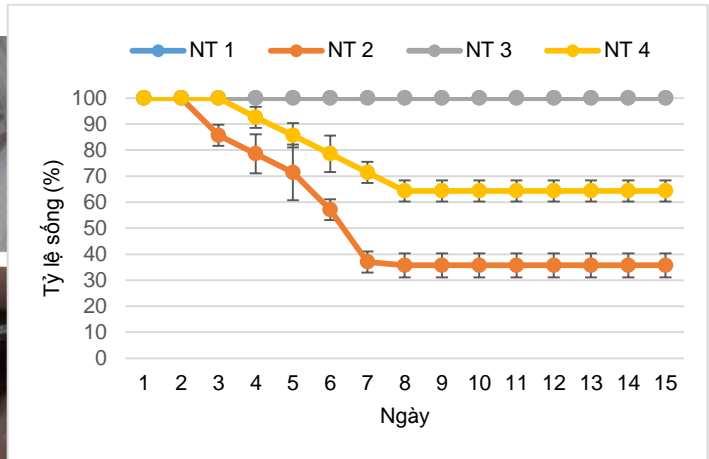
Ghi chú: Các giá trị trong cùng cột có các chữ cái a, b, c, d khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

**Tỷ lệ sống của cá**

Tỷ lệ sống của cá sau 15 ngày cảm nhiễm *S. iniae*, ở NT 2 và NT 4 lần lượt là 35,7% và 64,3%, trong khi đó ở NT 1 và NT 3 là 100%. Kết quả nghiên cứu này ghi nhận việc bổ sung *L. macroides* vào thức ăn cho cá chêm ăn có thể làm tăng miễn dịch và kháng lại vi khuẩn *S. iniae* trên cá chêm, do đó có thể sử dụng *L. macroides* bổ sung vào thức ăn để phòng bệnh xuất huyết do *S. iniae* gây ra trên cá chêm. Kết quả tái phân lập vi khuẩn từ gan, lách, thận và não cá bị bệnh xuất huyết ở NT 2 và NT 4 cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập được có các đặc điểm sinh hóa tương đồng với chủng *S. iniae* HTA3 cảm nhiễm trên cá. Trong khi đó ở NT 1 và NT 3 không phân lập được vi khuẩn gây bệnh từ gan, lách, thận và não của cá.



**Hình 4. Kết quả cảm nhiễm *S. iniae* trên cá chêm**  
(A-Cá bị bệnh sau cảm nhiễm;  
B-Não cá bị xuất huyết)



**Hình 5. Tỷ lệ sống của cá chêm sau 15 ngày cảm nhiễm *S. iniae***

**KẾT LUẬN**

Bổ sung chủng vi khuẩn *L. macroides* CH1 mật độ  $10^9$  CFU/mL vào thức ăn và cho cá chêm ăn trong 30 ngày, số lượng tổng bạch cầu trong máu cá cao hơn so với cá chêm cho ăn thức ăn không bổ sung vi khuẩn *L. macroides*. Tỷ lệ sống của cá chêm sau 15 ngày cảm nhiễm *S. iniae* ở nghiệm thức bổ sung *L. macroides* vào thức ăn cao hơn so với nghiệm thức không bổ sung *L. macroides* vào thức ăn. Kết quả nghiên cứu này ghi nhận việc cho cá chêm ăn thức ăn có bổ sung vi khuẩn *L. macroides* làm tăng khả năng miễn dịch và kháng bệnh do vi khuẩn *S. iniae* gây ra trên cá chêm.

Cần tiếp tục thực hiện thử nghiệm đánh giá tác động của vi khuẩn *L. macroides* khi bổ sung vào thức ăn cho cá chêm trong điều kiện thực tế ở ao nuôi.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

Bacon CW, Hinton DM (2002). Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. *Biol Control* 23: 274-284.

Bromage ES, Thomas A, Owens L (1999). *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Dis Aquat Org* 36(3): 177-181.

Chinabut S, Limsuwan C, Kitsawat P (1991). Histology of The Walking Catfish *Clarias Batrachus*. *Aquatic Animal Health Research Institute*, 96 pp.

Creeper JH, Buller NB (2006). An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifer*) in freshwater cage culture. *Aust Vet J* 84(11): 408-411.

Crosbie PBB, Nowak BF (2004). Immune responses of barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), after administration of an experimental *Vibrio harveyi* bacterin by intraperitoneal injection, anal intubation and immersion. *J Fish Dis* 27: 623-632.

Donio MBS, Velmurugan S, Raman K, Babu MM, Citarasu T (2014) Antagonistic *Bacillus cereus* TC-1 isolated from solar salt work in southern India. *J Microb Biochem Technol* 6: 242-246.

Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước, Đặng Thị Hoàng Oanh (2018). Nghiên cứu đặc điểm bệnh học của vi khuẩn *Streptococcus iniae* trên cá chêm (*Lates calcarifer*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 54(3B): 156-163.4

Hich VT, Quyen HDV, Dung HN, Wergeland HI (2013). Experimental *Streptococcus iniae* infection in barramundi (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *Int J Aquat Sci* 4(1): 3-12.

- Khuyen TD, Syaghalirwa NM, Valérie C, Jessica D, Stéphane B, Peter B, Felipe ER, Lluís T, Patrick K (2017). Physiological and immune response of juvenile rainbow trout to dietary bovine lactoferrin. *Fish Shellfish Immunol* 71(2017): 359-371.
- Kumar V, Sahu NP, Pal AK, Kumar S (2007). Immunomodulation of *Labeo rohita* juveniles due to dietary gelatinized and non-gelatinized starch. *Fish Shellfish Immunol* 23(2):341-53.
- Nithya C, Aravindraja C, Pandian SK (2010). *Bacillus pumilus* of Palk Bay origin inhibits quorum-sensing-mediated virulence factors in Gram-negative bacteria. *Res Microbiol* 161:293-304.
- Sivakumar, N., Sundararaman, M and Selvakumar, G. (2012). Probiotic effect of *Lactobacillus acidophilus* against vibriosis in juvenile shrimp (*Penaeus monodon*). *Afr J Biot* 11(91): 15811- 15818.
- Suanyuk N, Sukkasame N, Tanmark N, Yoshida N, Itami T, Thune RL, Tantikitti C, Supamattaya K (2010). *Streptococcus iniae* infection in cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*) and red tilapia (*Oreochromis* sp.) in southern Thailand. *Songklanakarin J Sci Technol* 32(4):341-348.
- Walter J, Hertel C, Tannock GW, Lis CM, Munro K, Hammes WP (2001). Detection of *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* and *Weissella* species in human feces by using group-specific PCR primers and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67:2578–2585.
- Wendover N (2010). Important disease of farmed barramundi in Asia. *Aqua Asia Pacific* 6: 26-29.
- Zinkl JG, Cox WT, Kono CS (1991). Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six species of fish. *Comp Haematol* 1:187-195.

## THE EFFECT OF *LYSINIBACILLUS MACROIDES* ON THE IMMUNE RESPONSE AND RESISTANCE POTENTIAL OF THE BARRAMUNDI (*LATES CALCARIFER*) TO *STREPTOCOCCUS INIAE*

Truong Thi Hoa<sup>\*</sup>, Nguyen Duy Quynh Tram, Tran Nam Ha

Faculty of Fisheries, University of Agriculture and Forestry, Hue University

### SUMMARY

This study was conducted to evaluate the effect of *Lysinibacillus macroides* on immune response and resistance potential of barramundi (*Lates calcarifer*) disease caused by *Streptococcus iniae*. The experiments were designed in 4 treatments with 3 replicates. Mixed feed which was supplied with *Lysinibacillus macroides* in commercial products was provided for barramundi for 30 days. Blood samples were collected on the 1<sup>st</sup>, 15<sup>th</sup> and 30<sup>th</sup> days for analysing the haematological, the inhibiting ability of barramundi serum to *S. iniae* and the activity of lysozyme. The results showed that *L. macroides* CH1 strongly inhibited against *S. iniae*. We found that red blood cells and white blood cells of fish are higher. Furthermore, the inhibiting potential of barramundi serum to *S. iniae* and the lysozyme activity of serum were significantly higher in the treatment of *L. macroides* supplement to the barramundi diet than in the control treatment ( $p < 0.05$ ). The survival rate at the 15<sup>th</sup> day postinfection was much higher in the treatment of *L. macroides* supplement to the barramundi diet (64.3%) than in the control treatment (35.73%) ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** Barramundi, immune response, *Lysinibacillus macroides*, *Streptococcus iniae*.

<sup>\*</sup> Author for correspondence: Tel: 0987558787; Email: truongthihoa@huaf.edu.vn