

ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG CỦA NHÓM VI KHUẨN LACTIC *Lactobacillus* spp. ĐỐI KHÁNG VỚI LOÀI VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* & *Aeromonas hydrophila* GÂY BỆNH TRÊN CÁ TRA BỘT (*Pagasianodon hypophthalmus*)

Nguyễn Thành Luân*, Phạm Quỳnh Vân, Phạm Quỳnh Anh, Nguyễn Tam Minh Hòa, Diệp Hà Như Ý

Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Việc sử dụng probiotics trong phòng bệnh trên cá được xem là phương pháp an toàn, tiềm năng và bền vững đối với ngành thủy sản cũng như giúp nâng cao và cải thiện chất lượng môi trường nước. *Edwardsiella ictaluri* (EI) được biết đến là loài vi khuẩn gây bệnh gan thận mũ và vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (AH) gây bệnh xuất huyết ở các loài cá tra. Chúng thường bị ức chế sau khi thử nghiệm đối kháng *in vitro* bởi các loài vi khuẩn lactic acid (LAB) như *Lactobacillus acidophilus* (LAT) và *Lactobacillus plantarum* (BB2). Nghiên cứu này đã xác định được nồng độ gây bệnh của 2 loài vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (EI) và *Aeromonas hydrophila* (AH) ở mật độ sinh khối 10^5 CFU/mL. Nồng độ được sử dụng để đối kháng *in vitro* các loài gây bệnh từ các loài vi khuẩn *Lactobacillus* sp. ở mật độ 10^8 CFU/mL. Tỷ lệ phối trộn 1:1 của 2 chủng *Lactobacillus* sp. LAT và BB2 được lựa chọn cho khả năng kháng khuẩn hiệu quả trên cả hai đối tượng gây bệnh và thử nghiệm trên cá tra bột từ khi mới nở đến 1 tuần tuổi được nuôi trong các bể thử nghiệm riêng lẻ để ngăn ngừa sự hao hụt số lượng. Định lượng acid lactic chỉ ra rằng acid lactic tỷ lệ nghịch với sự gia tăng pH trong môi trường kháng khuẩn của các chủng *Lactobacillus*. Nghiên cứu chuyên sâu về thành phần kháng khuẩn có thể tạo ra chế phẩm cần được đánh giá nhiều hơn để mang đến tiềm năng không những sử dụng trong phòng và chữa bệnh trên cá tra mà còn có thể được ứng dụng vào nuôi trồng các loài thủy sản chất lượng cao, an toàn và sạch bệnh.

Từ khóa: *Aeromonas hydrophila*, cá tra bột, *Edwardsiella ictaluri*, *Lactobacillus* spp., probiotics.

MỞ ĐẦU

Diện tích nuôi trồng cũng như sản lượng cá tra tăng theo từng năm, đưa sản xuất cá tra trở thành một trong những nguồn thu ngoại tệ lớn của Việt Nam (Tổng cục Thủy sản Việt Nam, 2017 & 2018). Việc mở rộng diện tích nuôi trồng nhằm gia tăng lợi nhuận với việc không được quy hoạch, nhận thức đúng cùng kinh nghiệm kém trong việc phòng và chữa bệnh cho cá nuôi làm cho môi trường nuôi cá không còn đảm bảo an toàn, mất cân bằng dinh dưỡng, độc tố, tác động tiêu cực đến năng suất. Chất lượng sản phẩm cá tra Việt Nam bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Sự ảnh hưởng đời sống cá tra chủ yếu đến từ sự tấn công của các loài virus, vi nấm, vi khuẩn (Phạm Thị Kim Oanh và Trương Hoàng Minh, 2011). Đồng thời, việc xuất hiện bệnh gan thận mũ do *Aeromonas hydrophila* (AH) và nhiễm trùng máu do *Edwardsiella ictaluri* (EI) ở cá tra trong nuôi trồng thủy sản công nghiệp gây thiệt hại nặng cho sản xuất tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (Tran *et al.*, 2013). Vấn đề nhiễm bệnh thường được giải quyết bằng vôi bột, thuốc sát trùng, kháng sinh nhưng lâu dài lại có khả năng ảnh hưởng đến điều kiện sống của cá với nguy cơ cao về khả năng kháng thuốc (Pirarat *et al.*, 2016).

Việc ứng dụng tiêm các vaccine nhược độc cho giai đoạn cá bột được nghiên cứu với tiềm năng hiệu quả cao nhưng chi phí tốn kém trong quá trình sản xuất và phối trộn, xử lý bằng phương pháp này cần được lặp lại thường xuyên, đòi hỏi trình độ chuyên môn cao (Gatesoupe, 2008). Vì thế, việc sử dụng probiotics được chú ý nghiên cứu và đánh giá như giải pháp khắc phục với probiotics có khả năng ức chế mầm bệnh, an toàn đối với môi trường thủy sản. Bên cạnh đó, chúng còn tác động tích cực lên vật chủ như một yếu tố tăng trưởng, cân bằng dinh dưỡng, cải thiện môi trường nước (Hongyu *et al.*, 2019). Vi khuẩn lactic trong đó có vi khuẩn *Lactobacillus* spp. được biết đến là loài vi khuẩn có khả năng ức chế mạnh một số loài vi khuẩn gây bệnh trong thực phẩm, nông nghiệp, chế phẩm và xử lý môi trường. Loài vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* được phát hiện trong một số trường hợp cá nhiễm bệnh và chủng này chủ yếu ứng dụng cho cải thiện môi trường nước ao nuôi (Vaquez *et al.*, 2005). Vi khuẩn *Lactobacillus plantarum* được tìm thấy trên tất cả mẫu bệnh phẩm do AH và EI gây ra (Tran *et al.*, 2013). Sự phối trộn hai chủng này với mục đích tạo ra chế phẩm phòng bệnh cho cá tra, đồng thời cải thiện môi trường nước nuôi cá mở ra nhiều triển vọng đánh giá nghiên cứu về vi khuẩn tương tác ở cá tra bằng đối kháng sinh học (Older *et al.*, 2024).

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Hai chủng vi khuẩn gây bệnh *Edwardsiella ictaluri* (EI), *Aeromonas hydrophila* (AH) và bốn chủng vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* (LA, LAT), *Lactobacillus plantarum* (BB1, BB2) chọn lọc từ ngân hàng giống nghiên cứu

có khả năng kháng khuẩn cao tại phòng thí nghiệm thuộc Khoa Sinh học và Môi trường thuộc trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh. Môi trường Brain Heart Infusion broth (BHI-broth), MRS được sử dụng cho tăng sinh và hoạt hoá vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila* cùng các chủng *Lactobacillus acidophilus* LA, LAT tương ứng. Các hóa chất chính với NaOH 1N và phenolphthalein, kháng sinh Tetracycline 0,001% và nước muối sinh lý được sử dụng trong định lượng acid lactic và các chất đối chứng so sánh hiệu quả của sản phẩm probiotics với khả năng kháng vi khuẩn EI và AH trong nghiên cứu *in vitro*.

Phương pháp nghiên cứu

Xác định khả năng đối kháng của *Lactobacillus acidophilus* và *Lactobacillus plantarum* đối với các nồng độ *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*

Các dịch tăng sinh sẽ được pha loãng đến nồng độ thí nghiệm dựa trên kết quả của thí nghiệm xác định độc lực. EI và AH được tăng sinh trên môi trường thạch BHI khảo sát từ nồng độ tế bào 10^3 đến 10^7 CFU/mL theo phương pháp đục lỗ với sáu giếng, mỗi giếng được bổ sung 100 μ L dung dịch: kháng sinh tetracycline 0.001% (đối chứng dương), nước muối sinh lý (đối chứng âm), 4 giếng với chủng vi khuẩn *Lactobacillus* sp. sử dụng trong các thí nghiệm LA, LAT, BB1, BB2. Các đĩa được ủ ở nhiệt độ 37°C trong vòng 24 giờ, thu nhận kết quả đường kính vòng kháng khuẩn (mm).

Định lượng acid lactic

Phương pháp định lượng acid lactic được sử dụng dựa trên phương pháp của Therner (Vazquez *et al.*, 2005) với hai chủng vi khuẩn *Lactobacillus*. sau khi được nuôi cấy trong 10 mL môi trường MRS-broth, ly tâm loại sinh khối, thêm 20 mL nước cất. Cho vào 1-2 giọt phenolphthalein 1%. Tiến hành chuẩn độ bằng NaOH 0,1N đến khi dịch xuất hiện màu hồng nhạt bền trong 30 giây thì ngừng chuẩn độ. Khi đó độ acid lactic ($^{\circ}$ T) được tính bằng công thức:

$$^{\circ}\text{T} = V_{\text{NaOH}} \times 10$$

Với $1^{\circ}\text{T} \approx 9$ mg acid lactic

Từ kết quả này, nhận xét được hàm lượng acid lactic được sinh ra theo thời gian.

Đối kháng với tổng sản phẩm thứ cấp ngoại bào loại acid của *Lactobacillus* được chọn với hai chủng gây bệnh EI và AH

Hai chủng *Lactobacillus* sp. lựa chọn được nuôi cấy trong môi trường canh lỏng MRS Broth với các mốc thời gian nhất định khảo sát ở 24 giờ, 30 giờ, 36 giờ, 42 giờ, 48 giờ, 54 giờ, 60 giờ, 66 giờ và 72 giờ. Mẫu tăng sinh được chọn lọc thể tích hút ở 1 mL dịch, ly tâm loại bỏ sinh khối. Sau đó, mẫu được tiến hành thử nghiệm đối kháng bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch trên một đĩa môi trường BHI-Agar với 4 lỗ thạch được khảo sát bao gồm: nước làm đối chứng âm, kháng sinh làm đối chứng dương, 1 lỗ cho LAT/LA và lỗ còn lại cho BB1/BB2. Mẫu được thu nhận kết quả đối kháng, so sánh với hàm lượng acid lactic sinh ra trong cùng mốc thời gian để tìm kiếm mối quan hệ giữa lượng acid lactic sinh ra với khả năng đối kháng với hai chủng gây bệnh EI và AH ở nồng độ từ 10^3 - 10^7 CFU/mL.

Lựa chọn tỷ lệ phối trộn hai chủng *Lactobacillus* phù hợp cho kháng khuẩn

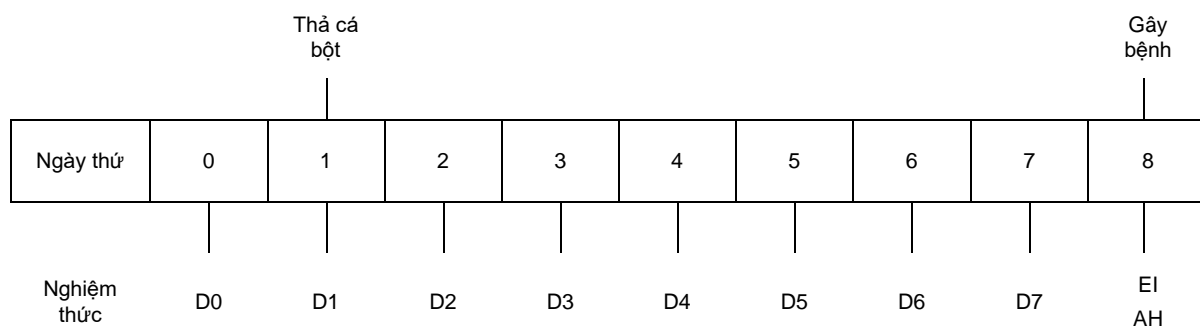
Kết quả của thí nghiệm đối kháng được tiếp tục sử dụng trong khảo sát khả năng đối kháng của 2 chủng *Lactobacillus* spp. với chủng gây bệnh để lựa chọn nồng độ kháng khuẩn. Tỷ lệ giữa *L. acidophilus*: *L. plantarum* (LAT và BB2) được khảo sát tương ứng ở 1:1, 2:1 và 1:2, được đánh giá với tổng thể tích là 60 μ L vi khuẩn đối kháng. Vì vậy, việc chọn lọc thể tích cấy cho vi khuẩn gây bệnh EI và AH khảo sát với thể tích 60 μ L, 120 μ L và 180 μ L ở mô hình *in vitro* tương ứng tỷ lệ 1:1, 1:2 và 1:3 về thể tích và mật độ vi sinh vật.

Ứng dụng nồng độ phối trộn trên để khảo sát tỷ lệ sống chết ở giai đoạn cá bột

Bố trí thí nghiệm với 8 lô cho vi khuẩn *E. ictaluri* độc lập, bao gồm: 1 lô đối chứng (chỉ thả cá, không bổ sung chế phẩm), 7 lô nghiệm thức theo dõi tương ứng các ngày khảo sát (Biểu đồ 1). Cá bột được mua từ trung tâm giống cá tra từ Viện Nghiên cứu và Nuôi trồng Thủy sản 2, Thành phố Hồ Chí Minh. Nguồn cá thí nghiệm là cá mới nở đến 8 ngày tuổi được ươm nuôi theo quy trình từ Viện Nuôi trồng Thủy sản 2 một cách độc lập theo lô thí nghiệm. Cách chăm sóc quản lý dịch bệnh đảm bảo vô trùng khi bàn giao mẫu cá tra bột theo 10 con/lô thí nghiệm. Các nghiệm thức thử nghiệm theo chu kỳ 7 ngày (theo lô D0 đến D7 là ngày bổ sung chế phẩm). Tại ngày 1, tương ứng với nghiệm thức D1, sẽ bổ sung cá vào tất cả các thùng nghiệm thức. Vì vậy, với thùng D0 có ý nghĩa là bổ sung chế phẩm trước khi thả cá 1 ngày, từ ngày D1 sử dụng phương pháp cảm nhiễm qua phương pháp tẩm có ý nghĩa là bổ sung cá và chế phẩm cùng lúc từ nghiệm thức tối ưu theo tỷ lệ 1:1 tương ứng mật độ cảm nhiễm 10^8 CFU/mL với thể tích 180 mL dịch khuẩn, D2 có ý nghĩa là bổ sung chế phẩm sau khi thả cá 1 ngày, D3 có ý nghĩa là bổ sung chế phẩm sau khi thả cá 2 ngày, các nghiệm thức D4, D5, D6, D7 lần lượt bổ sung chế phẩm sau khi thả cá 3, 4, 5, 6 ngày. Đến ngày thứ 8, sẽ bổ sung chủng gây bệnh EI tương ứng theo tỷ lệ gây chết 50% 10^8 CFU/mL. Sau đó, tỷ lệ cá sống được theo dõi ở ngày 8, 9, 10. Thí nghiệm được thực hiện tương tự đối với AH theo tỷ lệ cảm nhiễm gây chết 50% 10^8 CFU/mL bằng phương pháp tẩm.

Tỷ lệ sống = số cá còn sống/số cá ban đầu *100

Lựa chọn nghiệm thức có tỷ lệ sống cao và ổn định nhất.



Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại, thu nhận tỷ lệ cá sống trong tổng số cá thả, số liệu được thu nhận và xử lý theo phần mềm Statgraphics centurion XVI.

Biểu đồ 1. Biểu đồ bố trí nghiệm thức khảo sát theo mô hình thực nghiệm ở giai đoạn cá bột

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Xác định khả năng đối kháng của *L. acidophilus* và *L. plantarum* đối với các nồng độ *E. ictaluri* (EI) và *A. hydrophila* (AH).

Khả năng đối kháng của *Lactobacillus acidophilus* (LAT, LA) giảm theo sự tăng nồng độ EI. Chủng LAT không có khả năng ức chế nồng độ EI 10^7 CFU/mL. Trong khi đó LA chỉ có hiệu suất ức chế duy nhất ở nồng độ EI 10^3 CFU/mL các nồng độ còn lại từ 10^4 - 10^7 CFU/mL không có sự đối kháng (Bảng 1).

Bảng 1. Khả năng đối kháng của vi khuẩn *L. acidophilus* (LA và LAT) với *E. ictaluri* (EI)

| Nồng độ EI (CFU/mL) | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) | | |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| | Kháng sinh | LAT | LA |
| 10^3 | 20,00 ± 1,15 ^a | 15,67 ± 0,88 ^a | 5,00 ± 0,32 ^a |
| 10^4 | 18,00 ± 1,00 ^{ab} | 14,67 ± 0,88 ^{ab} | 0 ^b |
| 10^5 | 18,67 ± 0,88 ^{ab} | 13,00 ± 0,58 ^{bc} | 0 ^b |
| 10^6 | 15,50 ± 0,50 ^{ab} | 12,00 ± 0,00 ^c | 0 ^b |
| 10^7 | 16,00 ± 4,00 ^{ab} | 0 ^d | 0 ^b |

*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%, $p < 0,05$.

Trong khoảng nồng độ từ 10^3 - 10^5 CFU/mL của AH, khả năng kháng khuẩn của hai chủng *Lactobacillus* giảm dần nhưng không có sự chênh lệch nhiều giữa các nồng độ (Bảng 2). Từ nồng độ 10^6 CFU/mL trở lên, LAT và LA không có khả năng kháng khuẩn (Bảng 2). Sự khác biệt về khả năng kháng khuẩn của LAT và LA có thể là do sự khác nhau về thành phần, số lượng, hoạt tính của các sản phẩm ngoại bào, cách tác động của các yếu tố này hoặc khả năng đáp ứng khác nhau các yếu tố bất lợi của hai chủng gây bệnh (EI, AH).

Bảng 2. Khả năng đối kháng của vi khuẩn *L. acidophilus* LA và LAT) với *A. hydrophila* (AH)

| Nồng độ AH (CFU/mL) | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) | | |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Kháng sinh (ĐC) | LAT | LA |
| 10^3 | 20,67 ± 0,33 ^a | 6,67 ± 0,33 ^a | 3,67 ± 0,33 ^a |
| 10^4 | 20,33 ± 0,33 ^a | 6,67 ± 0,33 ^a | 4,00 ± 1,73 ^a |
| 10^5 | 20,33 ± 0,33 ^a | 5,00 ± 0,00 ^b | 4,00 ± 0,58 ^a |
| 10^6 | 20,67 ± 0,67 ^a | 0 ^c | 0 ^b |
| 10^7 | 14,33 ± 0,33 ^b | 0 ^c | 0 ^b |

*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%, $p < 0,05$.

Xác định khả năng đối kháng của *L. plantarum* đối với các nồng độ *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

Hai chủng *L. plantarum* BB1 và BB2 đều biểu hiện việc giảm khả năng đối kháng khi tăng nồng độ EI. Chủng BB1 đối kháng được với nồng độ 10^3 , 10^4 CFU/mL trong khi đó chủng BB2 duy trì khả năng kháng khuẩn từ 10^3 - 10^6 CFU/mL và luôn cho biểu hiện khả năng đối kháng tốt hơn chủng BB1 tương ứng là 11,33 và 10 mm so với 7 và 2 mm (Bảng 3).

Bảng 3. Khả năng đối kháng của *L. plantarums* (BB1, BB2) với *E. ictaluri* (EI)

| Nồng độ EI (CFU/mL) | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) | | |
|---------------------|----------------------------------|--------------------------|---------------------------|
| | Kháng sinh (ĐC) | BB1 | BB2 |
| 10^3 | 20,67 ± 0,33 ^a | 7,00 ± 0,00 ^a | 11,33 ± 2,40 ^a |
| 10^4 | 18,00 ± 0,33 ^a | 2,00 ± 0,00 ^b | 10,00 ± 1,00 ^b |
| 10^5 | 18,67 ± 0,33 ^a | 0 ^c | 8,00 ± 0,00 ^{ab} |
| 10^6 | 15,50 ± 0,67 ^a | 0 ^c | 7,00 ± 0,00 ^b |
| 10^7 | 16,00 ± 0,33 ^b | 0 ^c | 0 ^c |

*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%, $p < 0,05$.

Cả 2 chủng BB1 và BB2 đều cho thấy khả năng đối kháng tốt với AH ở nồng độ 10^3 - 10^5 CFU/mL. Tương tự, cả 2 chủng đều không cho thấy khả năng đối kháng với AH ở nồng độ 10^6 và 10^7 CFU/mL. Tuy khả năng kháng khuẩn giảm khi tăng nồng độ gây bệnh, giữa BB1 và BB2 không có sự khác nhau nhiều về đường kính vòng phân giải (Bảng 4). Sự khác nhau này có thể do các yếu tố kháng khuẩn khác nhau về thành phần, hàm lượng, hoạt tính, cách tác động, khả năng đáp ứng lại các yếu tố bất lợi của hai chủng gây bệnh (EI, AH) là khác nhau.

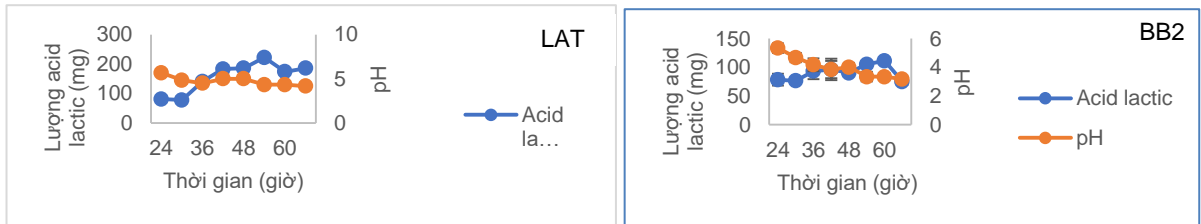
Bảng 4. Khả năng đối kháng của *L. plantarums* (BB1, BB2) với *A. hydrophila* (AH)

| Nồng độ AH (CFU/mL) | Đường kính vòng kháng khuẩn (mm) | | |
|---------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | Kháng sinh (ĐC) | BB1 | BB2 |
| 10^3 | 20,67 ± 0,33 ^a | 5,33 ± 0,67 ^a | 5,67 ± 0,67 ^a |
| 10^4 | 20,33 ± 0,33 ^a | 4,33 ± 0,67 ^{ab} | 4,67 ± 0,33 ^{ab} |
| 10^5 | 20,33 ± 0,33 ^a | 3,33 ± 0,33 ^b | 4,33 ± 0,33 ^b |
| 10^6 | 20,67 ± 0,67 ^a | 0 ^c | 0 ^c |
| 10^7 | 14,33 ± 0,33 ^b | 0 ^c | 0 ^c |

*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%, $p < 0,05$.

Định lượng acid lactic

Lượng acid lactic của LAT sinh ra nhiều hơn hẳn chủng BB2, tương ứng với khối lượng dao động từ 81-225 mg theo thời gian 24 - 66 giờ nghiên cứu. Lượng acid lactic của chủng BB2 tuy sinh ra ít nhưng luôn ổn định trong khoảng 75-110 mg trong cùng thời gian khảo sát. LAT có khả năng sinh acid lactic cao và khoảng pH biến động lớn hơn BB2 sẽ dễ gây ảnh hưởng đến ứng dụng tạo chế phẩm probiotics. Chủng LAT trong 24 giờ đầu tiên pH đạt $5,33 \pm 0,76$ mm cho thấy điều kiện môi trường này chưa phù hợp cho vi khuẩn phát triển. Do đó, acid lactic từ chủng BB2 được tiết ra để đạt pH thích hợp với tăng lượng acid lactic nhằm duy trì pH. Vì vậy, nghiên cứu có thể thấy sự tương phản của giai đoạn pH tăng thì acid lactic giảm và ngược lại (Hình 1).

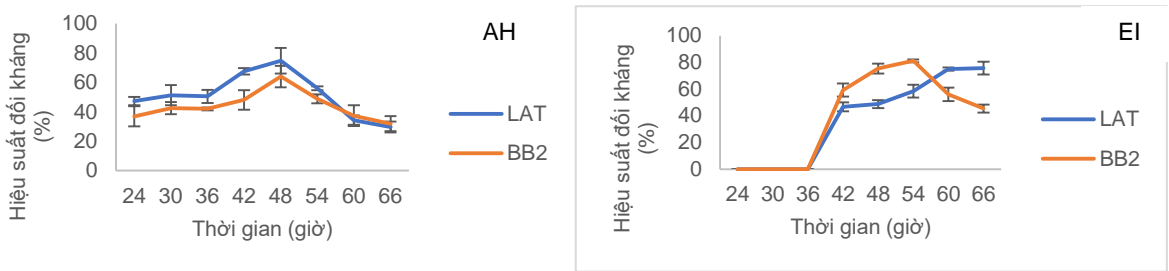


Hình 1. Sự thay đổi pH và acid lactic của LAT và BB2 theo thời gian

Đối kháng với tổng sản phẩm thứ cấp ngoại bào loại acid của LAT và BB2 với AH & EI

Hiệu suất kháng khuẩn của LAT sau khi loại acid tăng trong khoảng thời gian 24-48 giờ và giảm trong khoảng 48-66 giờ. Lượng acid lactic của LAT tăng liên tục trong 54 giờ đầu. Vậy, acid lactic không tác động hoặc tác động rất ít đến khả năng kháng khuẩn. Lượng acid lactic tăng, hiệu suất kháng khuẩn tại thời gian này cũng giảm, tại 66 giờ acid lactic của BB2 thấp hơn tại 24 giờ 3 mg/mL, nhưng hiệu suất đối kháng lại chênh lệch 5,01%; tại 66 giờ thấp hơn tại 30 giờ 0,5 mg/mL nhưng hiệu suất lại chênh lệch 10,61%. Khả năng kháng khuẩn của BB2 có được có thể là do các sản phẩm thứ cấp khác, không phải acid lactic, vì chưa thấy được sự tương quan giữa sự thay đổi của acid lactic và hiệu suất kháng khuẩn loại acid theo thời gian (Hình 2).

Lượng acid lactic LAT từ 24-30 giờ tạo ra còn ít có thể không đủ lượng để đối kháng với EI; từ 30-66 giờ, khả năng kháng khuẩn tăng liên tục trong khi hàm lượng acid lactic có sự thay đổi theo thời gian (tăng trong thời gian 30-54 giờ và giảm lúc 54-66 giờ). Vậy, acid lactic không ảnh hưởng đến khả năng kháng khuẩn của LAT mà do các sản phẩm thứ cấp khác. Khả năng kháng khuẩn của BB2 không có trong khoảng thời gian 24-36 giờ. Lượng acid lactic của BB2 ổn định trong khoảng nồng độ 75-110 mg/mL, từ 24-66 giờ. Sự thay đổi hiệu suất kháng khuẩn của BB2 đối với EI có thể là do các sản phẩm thứ cấp khác (Hình 2).



Hình 2. Hiệu suất đối kháng tổng sản phẩm thứ cấp ngoại bào loại acid của LAT và BB2 với AH & EI

Lựa chọn tỷ lệ phối trộn hai chủng phù hợp cho kháng khuẩn

Việc so sánh giữa các tỷ lệ phối trộn của LAT:BB2 cho thấy tỷ lệ 2:1 cho kết quả kháng khuẩn cao nhất ở hai thể tích EI thí nghiệm 60 µL, 120 µL tương ứng lần lượt là 6,33 ± 0,88 mm và 5,00 ± 0,00 mm. Tỷ lệ phối trộn 1:1 không có khả năng kháng khuẩn với vi khuẩn *A. hydrophila* (AH) gia tăng ở 180 µL. Tỷ lệ phối trộn của LAT và BB2 ở 1:1 cho kết quả đối kháng tốt ở 2 thể tích AH 60 µL và 120 µL, tương ứng là 6,33 và 5,50 mm. Vì vậy, tỷ lệ 1:1 (LAT:BB2) được lựa chọn cho thí nghiệm tiếp theo (Bảng 5). Tuy nhiên khả năng kháng khuẩn của các tỷ lệ phối trộn không có sự khác biệt nên có thể thay thế cho nhau. Với mục tiêu xác định một tỷ lệ LAT:BB2 phù hợp cho đối kháng cả hai chủng gây bệnh dù so với đối chứng vẫn còn nhiều hạn chế. Tuy nhiên, kết quả cần một tỷ lệ vi khuẩn an toàn hơn so với việc dùng kháng nên kết quả thí nghiệm này chọn tỷ lệ 1:1 cho những nghiên cứu thực nghiệm tiếp theo (Bảng 5).

Bảng 5. Khảo sát đường kính vòng phân giải với tỷ lệ phối trộn LAT:BB2 đối kháng các thể tích khác nhau của vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* (AH) và *Edwardsiella ictaluri* (EI)

| Thể tích AH & EI (µL) | Đường kính vòng phân giải theo tỷ lệ phối trộn LAT:BB2 (mm) | | | Bổ sung kháng sinh (ĐC) (mm) |
|-----------------------|---|----------------|----------------|------------------------------|
| | 1:1 | 2:1 (mm) | 1:2 | |
| 60 | 6,33 ± 0,33 ^a | 0 ^a | 0 ^a | 14,50 ± 0,87 ^a |
| 120 | 5,50 ± 0,29 ^b | 0 ^a | 0 ^a | 11,67 ± 0,33 ^b |
| 180 | 0 ^c | 0 ^a | 0 ^a | 11,00 ± 1,00 ^c |

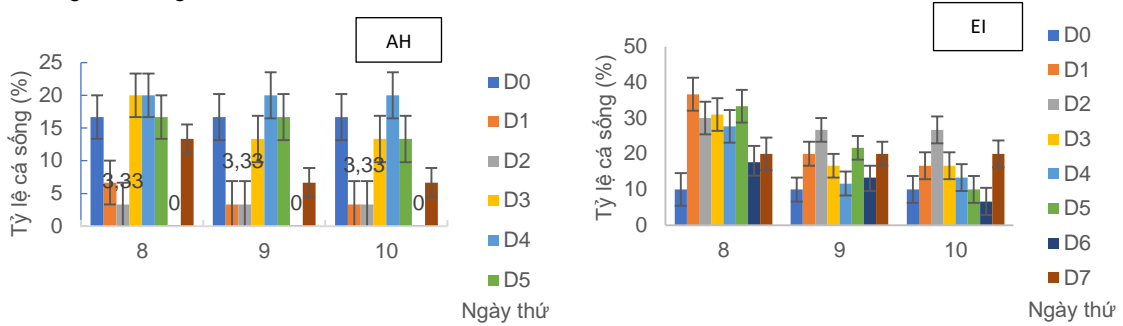
*Các giá trị a,b,c tương ứng cho biểu thị các cặp khác biệt có ý nghĩa thống kê bằng phần mềm Statgraphic Centurion XVI ở mức độ tin cậy 95%, p < 0,05.

Ứng dụng nồng độ phối trộn trên để khảo sát tỷ lệ sống chết ở giai đoạn cá bột với tỷ lệ cá sống vào ngày thứ 8, 9, 10, công độc bởi EI.

Tỷ lệ cá sống trong thí nghiệm công độc bởi AH cho thấy nghiệm thức D0, D2, D4, D6 không có sự thay đổi giữa 3 ngày khảo sát, nghiệm thức D1, D3, D5, D7 đều giảm. Không có nghiệm thức có tỷ lệ cá sống cao hơn 20%, kết quả cao nhất thu được là 20% của ngày thứ 8 của D3 và D4. Ứng dụng nồng độ phối trộn của LAT:BB2 trên cá tra bột cho thấy, sử dụng chế phẩm vào ngày thứ 2 sau thả cá bột đối với EI ngày thứ 4 sau thả cá đối với AH cho hiệu quả duy trì tỷ lệ cá sống ổn định (Biểu đồ 2).

Tỷ lệ cá tra bột sống sau khi công độc bởi EI cho kết quả có sự suy giảm qua từng ngày với ngày thứ 9 và thứ 10 của nghiệm thức D2, tỷ lệ cá sống không có sự thay đổi tương ứng ở tỷ lệ sống 26,67%. Trong khi đó, các

thực nghiệm còn lại có tỷ lệ cá sống giảm dưới 20%. Kết quả trên cho thấy ngày 8 công độc được xem là tối ưu với tỷ lệ thực nghiệm cho chủng *Edwardsiella ictaluri* (EI) khi thực nghiệm ở giai đoạn cá bột (Biểu đồ 2). Tuy nhiên, kết quả trên chưa đánh giá các yếu tố ảnh hưởng khác đến sự sinh tồn của cá như nguồn nước thay đổi hay những khả năng sinh học khác.



Biểu đồ 2. Biểu đồ tỷ lệ cá sống vào ngày thứ 8, 9, 10, công độc bởi AH & EI

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã đánh giá thành công với tỷ lệ phối trộn 1:1 của hai chủng *Lactobacillus* LAT và BB2 (nồng độ 10^8 CFU/mL) có khả năng kháng khuẩn tối ưu đối với hai chủng gây bệnh *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*. Tuy nhiên sản phẩm thứ cấp cũng như acid lactic mà các chủng *Lactobacillus* có khả năng ảnh hưởng đến môi trường nước nuôi. Thành phần kháng khuẩn của *Lactobacillus* spp. với lượng acid lactic có thể không phải nguyên liệu chủ yếu nên có thể nghiên cứu tạo ra chủng có hoạt tính kháng khuẩn cao nhưng lượng acid lactic được kiểm soát ở mức thấp để tránh ảnh hưởng đến đời sống sinh vật. Kết quả nghiên cứu có thể phát triển để hoàn thiện chế phẩm sinh học bổ sung vào môi trường nước nuôi để phòng bệnh ở các giai đoạn, mở ra tiềm năng sản phẩm vừa phòng bệnh vừa cải thiện môi trường nước, tăng tỷ lệ sống của cá tra trong giai đoạn ương nuôi.

Lời cảm ơn: Để thực hiện đề tài này, chúng tôi xin gửi lời cảm ơn đến sự hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu Đề tài cấp trường dành cho giảng viên và sinh viên Nghiên cứu Khoa học của Trường Đại học Công Thương Thành phố Hồ Chí Minh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Gatesoupe FJ (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J Mol Micor Biotech* 14(1-3): 107-114.
- Hongyu Z, Wang H, Hu K, Jiao L, Zhao M, Yang X and Xia L (2019). Effect of Dietary Supplementation of *Lactobacillus Casei* YYL3 and *L. Plantarum* YYL5 on Growth, Immune Response and Intestinal Microbiota in Channel Catfish, *Animals* 9(12): 1005 -1019.
- Older CE, Griffin MJ, Richardson BM, Waldbieser GC, Reifers JG, Goodman PM, Ware C, Gatlin D 3rd, Wise DJ, & Yamamoto FY (2024). Influence of probiotic and prebiotic supplementation on intestinal microbiota and resistance to *Edwardsiella ictaluri* infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) following florfenicol administration. *J Fish Dis*, 47 (4): 3663–3672.
- Pirarat N, Ooi EL, Thompson KD, Nguyen HT, Maita M. & Katagiri T (2016). Examination of entry portal and pathogenesis of *Edwardsiella ictaluri* infection in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) *Aquaculture*, 464:279-285.
- Phạm Thị Kim Oanh, Trương Hoàng Minh (2011), Thực trạng nuôi cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus* Sauvage) có liên kết và không liên kết ở Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 20: 48-58.
- Tổng cục Thủy sản Việt Nam (2017) theo báo cáo Văn Thọ, Bến Tre: Diện tích nuôi cá tra theo quy trình sản xuất tốt chiếm 29%.
- Tổng cục Thủy sản Việt Nam (2018) theo báo cáo của Hương Trà. Vụ Nuôi trồng thủy sản tổng kết công tác năm 2017 và triển khai nhiệm vụ năm 2018.
- Tran NT, Pham MD & Hatai K (2013). Overview of the use of probiotics in aquaculture, *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*, 3: 89-97.
- Vazquez., JA, Gonzalez., MP and Murado., MA (2005). Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquac Res* 245(1-4): 149-161.

ASSESSING THE IMPACT OF A MIXTURE OF LACTIC ACID BACTERIA, SPECIFICALLY *Lactobacillus* spp., AS ANTAGONISTS AGAINST *Edwardsiella ictaluri* AND *Aeromonas hydrophila*, WHICH CAUSE DISEASES IN *Pangasianodon hypophthalmus* DURING THE FRY STAGE

Nguyen Thanh Luan*, Pham Quynh Van, Pham Quynh Anh, Nguyen Tam Minh Hoa, Diep Ha Nhu Y

Ho Chi Minh City University of Industry and Trade

SUMMARY

The applications of probiotics are currently considering not only as safe, potential and sustainable methods for aquaculture but also improving and enhancing water environment quality. *Edwardsiella ictaluri* (EI) has been known as a bacteria causing white spots in kidney and liver organs of striped catfish and hemorrhagic disease caused by *Aeromonas hydrophila* (AH) in striped catfishes. These bacteria also had been experienced for *in vitro* experiments of competition by LAB bacteria such as *Lactobacillus acidophilus* (LAT) and *Lactobacillus plantarum* (BB2). This study investigated the concentration of biomass that could cause disease by *Edwardsiella ictaluri* (EI) and *Aeromonas hydrophila* (AH) respectively 10^5 CFU/mL. The concentration of *Lactobacillus* sp. biomass in *in vitro* competition for both bacteria is 10^8 CFU/mL. The ratio of 1:1 between LAT and BB2 has been chosen for bio-antimicrobiology *in vitro* and *in vivo* study that affect for both infectious bacteria and one-week premature striped catfish. Antimicrobial experiments has been shown there was no evidence of lactic acid as the main factor in affect antimicrobial ability of *Lactobacillus* specimen. Advanced research of bio-antimicrobial ingredients in bioproduct application could lead the better improvement for disease treatment in not only striped catfish but also high quality, safe and clean products in aquaculture.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, *Edwardsiella ictaluri*, *Lactobacillus* spp., probiotics, striped catfish.

* Author for correspondence: Tel: 0917577828; Email: luannt@huit.edu.vn