

PHÂN LẬP VÀ TUYỂN CHỌN VI KHUẨN ỨC CHẾ *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* GÂY BỆNH THÂN ĐEN TRÊN CÁ SẶC RẦN (*TRICHOGASTER PECTORALIS*)

Lê Thị Ánh Hồng^{1,✉}, Phạm Thị Minh Ngọc^{1,2}, Dương Khánh², Võ Văn Tuấn², Nguyễn Hoàng Dũng¹

¹Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Nông Lâm, Thành phố Hồ Chí Minh

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: anhhongbi@yahoo.com

Ngày nhận bài: 17.4.2020

Ngày nhận đăng: 21.9.2020

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Streptococcus agalactiae* là một trong những tác nhân gây nên bệnh thân đen trên cá Sặc rần (*Trichogaster pectoralis*) làm ảnh hưởng đến sự phát triển và chất lượng cá. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm phân lập và tuyển chọn vi khuẩn có khả năng ức chế *S. agalactiae*, có thể ứng dụng để kiểm soát vi khuẩn gây bệnh thân đen thay thế cho việc sử dụng kháng sinh. Từ các mẫu cá Sặc rần khỏe, mẫu bùn và nước ao nuôi cá tại Đồng Tháp, chúng tôi đã phân lập và sàng lọc được 14 chủng, tuyển chọn được chủng L7 có khả năng ức chế cao nhất có đường kính vòng vô khuẩn $9,3 \pm 0,57$ mm. Chủng tuyển chọn được định danh bằng phương pháp sinh học phân tử giải trình tự gen vùng 16S rRNA, tra cứu trên Ngân hàng Gen (NCBI) có kết quả tương đồng với loài *Bacillus subtilis*. Thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế *S. agalactiae* của vi khuẩn *B. subtilis* phân lập được trong điều kiện thực nghiệm cho thấy ở nghiệm thức đối chứng, cá sau khi được gây nhiễm với *S. agalactiae* ở mật độ 10^6 CFU/mL có tỷ lệ sống 41,7%. Các nghiệm thức thí nghiệm NT1, NT2, NT3 cá được gây nhiễm với *S. agalactiae* và xử lý với vi khuẩn *B. subtilis* ở mật độ 10^5 CFU/mL, 10^6 CFU/mL và 10^7 CFU/mL có tỷ lệ sống cao hơn so với nghiệm thức đối chứng không được xử lý *B. subtilis* và tỷ lệ lần lượt là 60%, 76,7% và 81,7%. Từ kết quả này có thể hướng tới tiềm năng sử dụng vi khuẩn *B. subtilis* phân lập được để phòng, kháng bệnh thân đen trên cá Sặc rần.

Từ khóa: *Bacillus subtilis*, bệnh thân đen, cá Sặc rần, *Streptococcus agalactiae*, *Trichogaster pectoralis*.

ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá Sặc rần hay còn gọi là cá sặc bổi, cá lò tho, có tên khoa học là *Trichogaster pectoralis* là loài cá sống ở nước ngọt và nước lợ, phân bố rộng rãi trong vùng nhiệt đới về phía lưu vực sông MeKong, Thái Lan, Lào, Cambodia và Việt Nam. Cá sặc rần được đánh bắt với sản lượng ngày càng tăng, từ 25.751 tấn năm 1999 đến năm 2014 đạt 40.034 tấn (FAO, 2017). Trong những năm gần đây, mô hình nuôi cá Sặc

rần được phát triển phổ biến ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long do những lợi ích về mặt kinh tế cho người nuôi. Cũng như các nghề nuôi thủy sản khác, quá trình nuôi cá Sặc rần cũng gặp nhiều trở ngại do dịch bệnh. Trong đó bệnh thân đen đã và đang được xem là một trong những mối nguy đối với nghề nuôi cá do cá bị nhiễm bệnh có tỷ lệ chết khá cao trong cả giai đoạn ương giống và nuôi thương phẩm. Nghiên cứu về bệnh thân đen trên cá Sặc rần (*Trichogaster pectoralis*) nuôi thâm canh ở

Đồng Tháp, tác giả Phan Thị Lệ Hoa và Từ Thanh Dung (2014) đã phân lập và xác định một trong những tác nhân gây bệnh là do cá nhiễm vi khuẩn *Streptococcus agalactiae*. Nhóm nghiên cứu của Viện Sinh học Nhiệt đới cũng có kết quả nghiên cứu tương tự và xác định liều gây chết LD₅₀ của *S. agalactiae* sau 14 ngày thí nghiệm trên cá Sặc rằn là 2,1 x 10⁶ CFU/mL.

Hiện nay, người nuôi thường sử dụng kháng sinh để trị bệnh cho cá. Tuy nhiên việc sử dụng không đúng thuốc, sử dụng quá liều hay sử dụng với mục đích phòng ngừa bệnh đã gây nên tình trạng vi khuẩn kháng kháng sinh dẫn tới hiệu quả điều trị không cao hoặc dư lượng kháng sinh còn tồn lưu trong thịt cá thương phẩm gây ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe người tiêu dùng. Để hạn chế tình trạng này, nhiều nghiên cứu được thực hiện trong đó hướng sử dụng vi khuẩn có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh ở thủy sản ngày càng được quan tâm (Tu *et al.*, 2008; Iman *et al.*, 2013; Nazmul *et al.*, 2014).

Mục đích của nghiên cứu này nhằm phân lập và tuyển chọn được chủng vi khuẩn địa phương có khả năng ức chế được vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh thân đen trên cá Sặc rằn, có thể ứng dụng tạo chế phẩm vi sinh phòng, kháng bệnh thân đen phục vụ cho nghề nuôi cá Sặc rằn đã và đang phát triển tại vùng đồng bằng sông Cửu Long.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các mẫu nước, mẫu bùn và mẫu cá Sặc rằn khỏe được thu thập từ các ao nuôi tại xã Láng Biền, huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp. Mẫu cá khỏe là cá có biểu hiện bình thường, màu sắc sáng, nhanh nhẹn, ao nuôi không xuất hiện cá chết. Tất cả các mẫu sau khi thu được giữ lạnh và vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập vi sinh.

Chủng vi khuẩn *S. agalactiae* đã được phân lập và xác định là tác nhân gây bệnh thân đen trên cá Sặc rằn, định danh ở các nghiên cứu

trước và được lưu trữ tại Viện Sinh học Nhiệt đới.

Phương pháp

Phân lập và chọn lọc sơ bộ vi sinh vật có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae*

Vi khuẩn được phân lập từ mẫu cá Sặc rằn khỏe, mẫu bùn và mẫu nước được thu thập từ các ao nuôi tại xã Láng Biền, huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp. Mẫu cá trước khi phân lập được khử trùng bên ngoài bằng ethanol 70°, cá được giải phẫu để lấy các phần riêng biệt gồm nội tạng, cơ, và não cá. Quá trình phân lập được thực hiện theo phương pháp pha loãng, trải trên đĩa môi trường thạch dinh dưỡng nutrient agar (NA) có thành phần cao thịt bò 1 g, cao nấm men 2 g, peptone 5 g, NaCl 5 g, agar 15, nước cất vừa đủ 1 lít, pH 7. Các đĩa được ủ ở 28°C, sau 48 giờ, những khuẩn lạc giống nhau về hình thái và chiếm đa số được cấy ria cho đến thuần.

Chọn những chủng có khả năng ức chế *S. agalactiae* bằng phương pháp ức chế vạch thẳng vuông góc: cấy vi khuẩn phân lập được dọc theo đường thẳng trên đĩa thạch, ủ ở 37°C trong 24 giờ, sau đó cấy vi khuẩn *S. agalactiae* theo các vạch vuông góc với vi khuẩn đã mọc, tiếp tục ủ ở 37°C trong 24 giờ (Lê Thị Hải Yên, Nguyễn Đức Hiền (2016). Những chủng vi khuẩn tạo vùng kháng sẽ được lựa chọn, bảo quản trong ống thạch nghiêng để thực hiện các thí nghiệm tiếp theo.

Đánh giá khả năng ức chế của vi sinh vật đối với vi khuẩn gây bệnh

Khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* được thực hiện bằng phương pháp nhỏ giọt (Galindo, 2004). Chủng vi khuẩn thí nghiệm được nuôi cấy lác trong môi trường NB có thành phần cao thịt bò 1 g, cao nấm men 2 g, peptone 5 g, NaCl 5 g, nước cất vừa đủ 1 lít, giá trị pH 7,0. Sau 24 giờ, hút 5 µL dịch nuôi nhỏ vào đĩa giấy vô trùng đặt trên đĩa môi trường NA, tiếp tục ủ ở 30°C trong 24 giờ cho khuẩn lạc phát triển. Cho 5 mL môi trường thạch mềm TSB (tryptone 17 g, soya peptone 3 g, NaCl 5 g, KH₂PO₄ 2,5 g, glucose 2,5 g, agar 5 g, nước cất vừa đủ 1 lít) và dịch *S. agalactiae* được tăng

sinh sau 24 giờ vào đĩa đã có khuẩn lạc thí nghiệm phát triển. Tiếp tục ủ các đĩa ở 28°C trong 48 giờ, các chủng có khả năng ức chế *S. agalactiae* sẽ tạo vòng vô khuẩn, so sánh đường kính vòng vô khuẩn (D-d) để chọn chủng vi sinh vật có khả năng ức chế *S. agalactiae* cao, trong đó D là đường kính vòng kháng ngoài, d là đường kính đĩa giấy. Tất cả các thí nghiệm thực nghiệm và thí nghiệm thức đối chứng đều được thực hiện 3 lần lặp lại.

Định danh chủng vi sinh vật được tuyển chọn

Tách chiết DNA tổng số

Vi khuẩn được nuôi cấy tăng sinh trên môi trường NB broth và ủ ở 37°C trong 24 giờ. Sau khi ủ, sinh khối tế bào vi khuẩn được thu thập bằng cách ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 10 phút. DNA tổng số được tách chiết từ sinh khối vi khuẩn bằng phương pháp CTAB (Minas *et al.*, 2011).

Khuếch đại trình tự 16S rDNA

DNA tổng số của vi khuẩn được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR để khuếch đại trình tự gen 16S rRNA bằng cách sử dụng cặp mồi 27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTAG-3') và 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). Phản ứng PCR được thực hiện với chu kỳ luân nhiệt như sau: Biến tính khởi đầu ở 95 °C trong 5 phút, tiếp theo là 35 chu kỳ gồm có: 95 °C trong 5 phút, 53 °C trong 10 giây, 72 °C trong 30 giây; và bước kéo dài cuối cùng ở 72 °C trong 10 phút. Sản phẩm PCR sau đó được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 1%.

Giải trình tự DNA và so sánh trên ngân hàng gene NCBI

Sản phẩm PCR vùng trình tự 16S rRNA được tinh sạch và giải trình tự. Trình tự gen sal đó được kiểm tra và so sánh sắp giống cột với các trình tự khác trên Ngân hàng gen bằng công cụ BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) nhằm tìm ra trình tự tương đồng và kết luận tên khoa học của vi khuẩn.

Đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *S. agalactiae* của vi sinh vật được tuyển chọn trong điều kiện thực nghiệm

Thí nghiệm một yếu tố được bố trí ngẫu nhiên trên hệ thống bể composit (100 L) tại trại Thực nghiệm Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Cá được chọn cho nghiên cứu là cá khỏe mạnh, linh hoạt, đồng cỡ (20 – 25 g/con) đảm bảo không nhiễm bệnh và ký sinh trùng và thuần dưỡng khoảng 1-2 tuần trước khi tiến hành thí nghiệm để cá được ổn định và quen với điều kiện sống trong bể.

Chủng vi sinh vật được tuyển chọn thí nghiệm được nuôi cấy tăng sinh 48 giờ trong môi trường lỏng NB. Dịch khuẩn gây bệnh *S. agalactiae* được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường TSB ở 28 °C trong 18 – 24 giờ. Thí nghiệm được thực hiện với 2 thí nghiệm thức đối chứng dương (+): cá được ngâm trong dịch khuẩn *S. agalactiae* có nồng độ 10⁶ CFU/mL, tương ứng với nồng độ gây chết cá LD₅₀ và đối chứng âm (-): cá được ngâm trong môi trường TSB; các thí nghiệm thức thí nghiệm NT1, NT2, NT3: cá được ngâm với *S. agalactiae* (10⁶ CFU/mL) và vi khuẩn thí nghiệm có nồng độ lần lượt 10⁵ CFU/mL, 10⁶ CFU/mL và 10⁷ CFU/mL. Tất cả đều được sục khí trong 3 giờ, sau đó cho vào bể thí nghiệm với mật độ 20 con/bể/ thí nghiệm thức. Thực hiện chế độ sục khí liên tục, cho ăn và không thay nước trong thời gian thí nghiệm. Số cá chết được ghi nhận hàng ngày, thí nghiệm kết thúc khi cá trong các thí nghiệm thức thí nghiệm không chết trong 3 ngày liên tục.

Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý và tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và phần mềm thống kê Minitab 18 (sử dụng trắc nghiệm LSD).

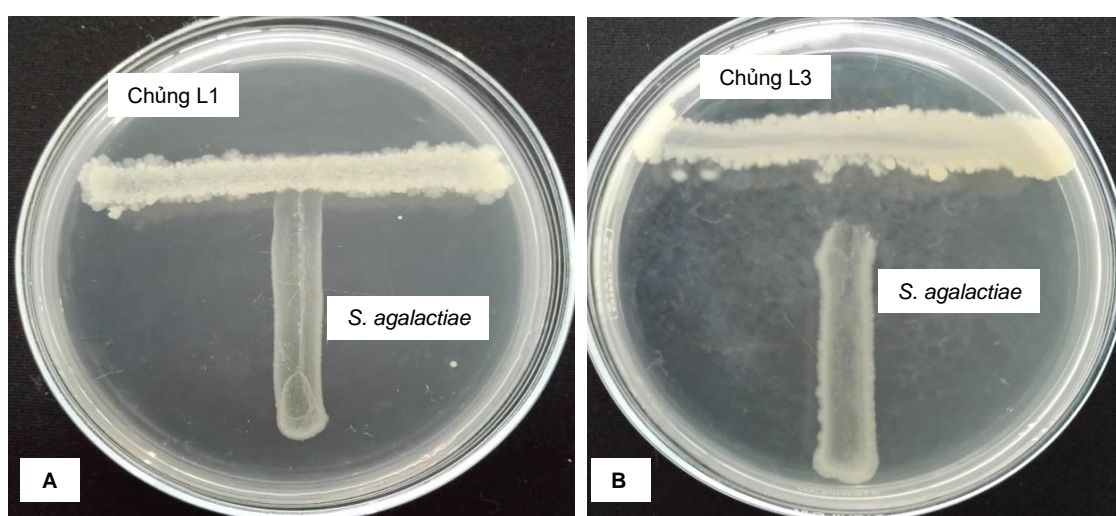
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập, tuyển chọn vi sinh vật có khả năng ức chế vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh thân đen trên cá Sặc rằn

Từ các mẫu nước, mẫu bùn và mẫu cá khỏe thu tại các ao nuôi cá Sặc rằn tại xã Láng Biền, huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp, chúng tôi đã phân lập, làm thuần được 31 chủng, ký hiệu từ L1 đến L31. Bằng phương pháp đối kháng vuông góc, sàng lọc sơ bộ được 14 chủng có khả năng ức chế *S. agalactiae* gồm L2, L3, L4, L6, L7, L9, L10, L11, L13, L15, L17, L19, L20 và L21. Trong đó có 2 chủng phân lập được từ mẫu bùn, 4 chủng từ mẫu nước, 1 chủng từ não cá, 2 chủng từ gan, 2 chủng từ thận và 3 chủng từ cơ của cá.

Kết quả quan sát các đặc tính sinh hóa, sinh lý của các chủng sàng lọc được cho thấy tất cả các chủng đều có tế bào hình que, Gram dương (ngoại trừ chủng L15 có Gram âm), có khả năng di động, có khả năng sinh tổng hợp các enzyme catalase, protease, cellulase, amylase (ngoại trừ chủng L4), oxidase và chitinase.

Các chủng vi khuẩn (14 chủng) này được so sánh khả năng ức chế vi khuẩn *S. agalactiae* dựa trên kích thước đường kính vòng vô khuẩn (ĐKVVK).



Hình 1. Biểu hiện sự ức chế của vi sinh vật đối với *S. agalactiae*. A: Chủng L1 không ức chế *S. agalactiae*, B: chủng L3 ức chế *S. agalactiae*.

Bảng 1. Đường kính vòng vô khuẩn của 14 chủng vi khuẩn thử nghiệm đối với vi khuẩn *S. agalactiae*

STT	Chủng vi khuẩn	ĐKVVK (mm)	STT	Chủng vi khuẩn	ĐKVVK (mm)
1	L2	2,7 ^{cd} ± 0,57	8	L11	3,0 ^{bcd} ± 0,00
2	L3	2,0 ^d ± 0,00	9	L13	2,0 ^d ± 0,00
3	L4	2,0 ^d ± 0,00	10	L15	4,0 ^b ± 0,00
4	L6	3,3 ^{bc} ± 0,57	11	L17	3,3 ^{bc} ± 1,15
5	L7	9,3^a ± 0,57	12	L19	3,3 ^{bc} ± 1,15
6	L9	2,0 ^d ± 0,57	13	L20	4,0 ^b ± 1,73
7	L10	2,7 ^{cd} ± 0,57	14	L21	2,3 ^{cd} ± 0,57

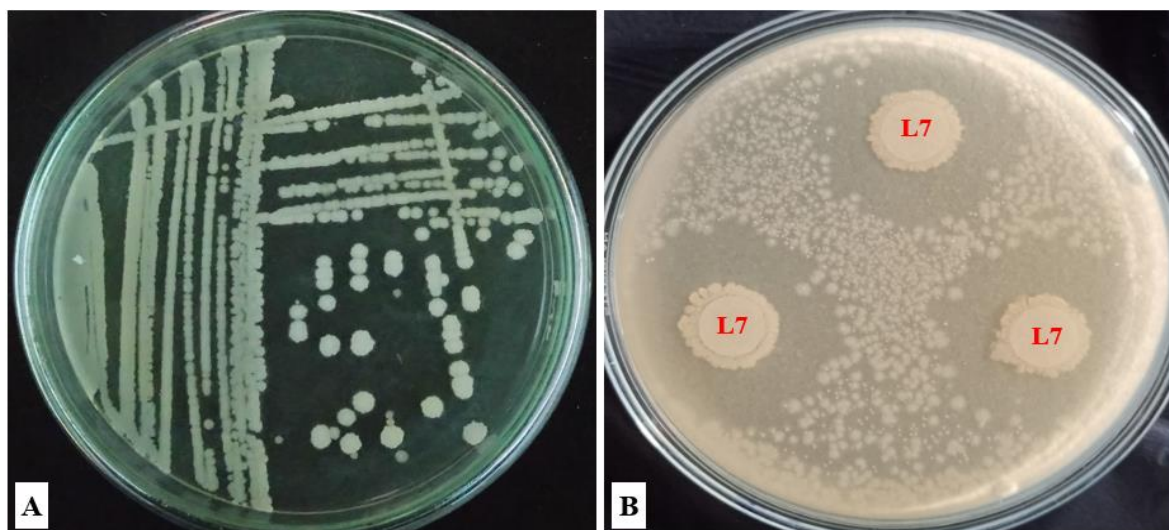
Trong cùng một cột, các giá trị trung bình có ký tự chữ theo sau giống nhau thì không có sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,01$)

Kết quả bảng 1 cho thấy, chủng L7 có khả năng ức chế *S. agalactiae* cao nhất so với 13

chủng còn lại. Đánh giá về mức độ khả năng ức chế theo quy ước của Galindo (2004) cho thấy

chủng L7 ức chế vi khuẩn *S. agalactiae* ở mức trung bình với đường kính vòng vô khuẩn là 9,3 mm ($6 \text{ mm} \leq \text{ĐKVVK} \leq 20 \text{ mm}$), các chủng còn lại ức chế ở mức yếu (đường kính vòng vô khuẩn nhỏ hơn 5 mm). Như vậy chủng L7 có

khả năng ức chế vi khuẩn *S. agalactiae* tương đương với một số chủng vi khuẩn lactic trong nghiên cứu của Ngô Thị Ngọc Trân (2016). Do đó chủng L7 được tuyển chọn để thực hiện các thí nghiệm kế tiếp.



Hình 2. Khả năng ức chế của chủng L7 đối với *S. agalactiae* A: Khuẩn lạc chủng L7; B: Chủng L7 ức chế *S. agalactiae*.

Định danh chủng L7 bằng kỹ thuật sinh học phân tử

DNA hệ gen của chủng vi khuẩn L7 đã được tách chiết và sử dụng làm khuôn để khuếch đại vùng trình tự 16S rRNA với cặp mồi 27F/1492R. Kết quả PCR được thể hiện trên bản điện di cho thấy đã khuếch đại thành công trình tự 16S rRNA với kích thước phù hợp (khoảng 1,5 kb). Sản phẩm PCR được gửi đi giải trình tự, trình tự gen được sắp giống cột và xử lý lại bằng phần mềm Snapgene v.4.3.10. Trình tự sau khi hiệu chỉnh được so sánh với các trình tự sẵn có trên Ngân hàng gen bằng công cụ BLAST (Bảng 2).

Kết quả cho thấy, trình tự 16S rRNA của chủng L7 có độ tương đồng cao với các chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus*. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên trình tự 16S rDNA của chủng L7 và các chủng vi khuẩn *Bacillus* tương

đồng bằng phần mềm MegAlign Pro v.18 (Hình 3).

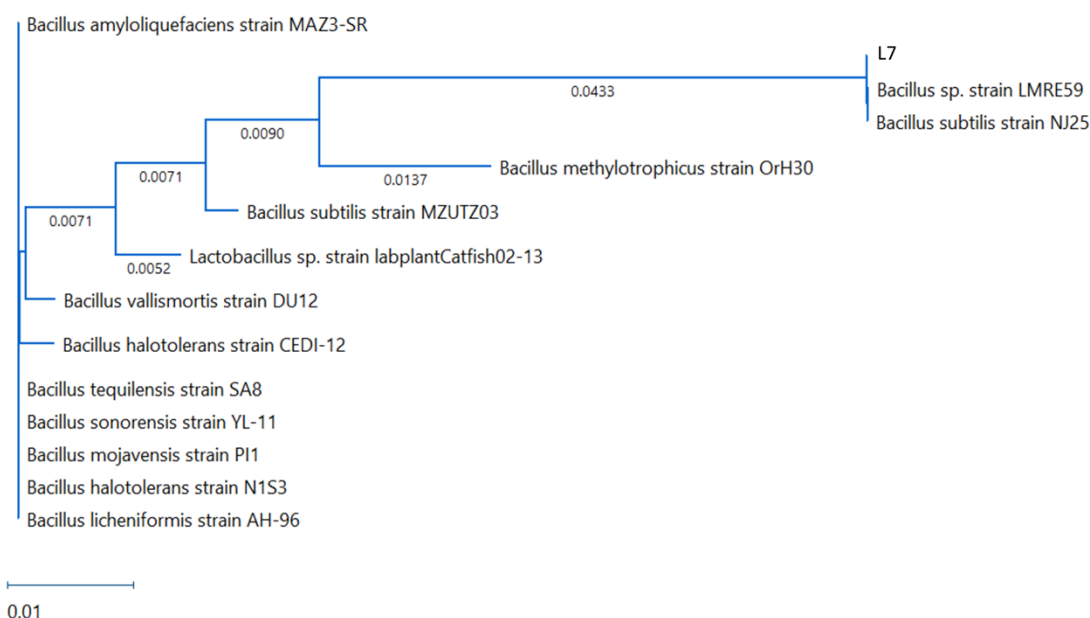
Kết quả cây phát sinh loài thể hiện chủng L7 thuộc nhánh vi khuẩn *Bacillus subtilis* với độ tương đồng trình tự đạt 99,86% với chủng NJ25 (Sequence ID: MG254841.1) và chủng *Bacillus* sp. strain LMRE59 (Sequence ID: MK571679.1) (Bảng 2). Do đó chúng tôi có thể kết luận chủng L7 thuộc loài *Bacillus subtilis*.

Theo các nghiên cứu trước đây cho thấy vi khuẩn *B. subtilis* rất có tiềm năng trong việc sử dụng để sản xuất probiotic vì chúng có thể sinh tổng hợp các enzyme ngoại bào như cellulase, amylase, caseinase giúp cải thiện tiêu hóa cho cá nuôi. Ngoài ra, loài vi khuẩn này còn có thể sản sinh các hợp chất kháng khuẩn, cạnh tranh dinh dưỡng và không gian sống góp phần ức chế vi khuẩn gây bệnh (Vaseeharan *et al.*, 2003) tương tự như chủng L7 phân lập được.

Bảng 2. Kết quả so sánh trình tự tương đồng của L19 với các trình tự trên Ngân hàng gen (NCBI).

Trình tự tương đồng trên Ngân hàng gen (NCBI)*	Max score	Total score	Query cover	E-value	Ident	Accession
<i>Bacillus subtilis</i> strain NJ25	1293	1293	99%	0.0	99.86%	MG254841.1
Bacillus sp. (in: Bacteria) strain LMRE59	1290	1290	99%	0.0	99.86%	MK571679.1
<i>Bacillus methylophilus</i> strain OrH30	1070	1070	99%	0.0	94.17%	KM081633.1
<i>Bacillus subtilis</i> strain MZUTZ03	1064	1064	99%	0.0	94.03%	KX822711.1
Lactobacillus sp. strain labplantCatfish02-13	1048	1048	99%	0.0	93.60%	MH250205.1
<i>Bacillus trquilensis</i> strain BY54	1033	1033	99%	0.0	93.18%	MN133901.1
<i>Bacillus licheniformis</i> strain AH-96	1031	1031	99%	0.0	93.17%	MT102967.1
<i>Bacillus halotolerans</i> strain CEDI-12	1031	1031	99%	0.0	93.17%	MN233378.1
<i>Bacillus mojavenis</i> strain P11	1031	1031	99%	0.0	93.17%	MK116582.1
<i>Bacillus sonorensis</i> strain YL-11	1031	1031	99%	0.0	93.17%	MK124965.1
<i>Bacillus vallismortis</i> strain DU12	1024	1024	99%	0.0	92.89%	MK177189.1

*Bảng được xây dựng dựa vào dữ liệu NCBI Blast.



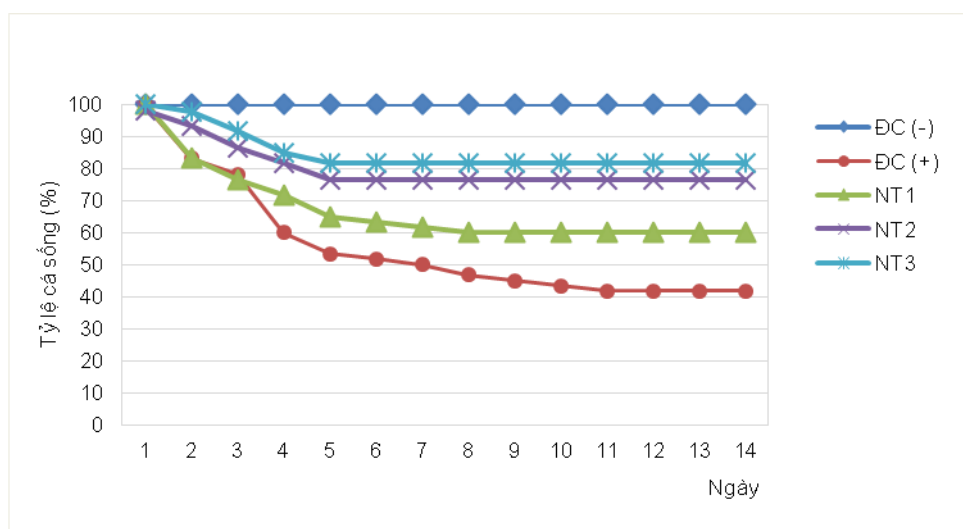
Hình 3. Cây phát sinh loài dựa trên trình tự 16S rDNA của chủng L7 và các chủng vi khuẩn *Bacillus* tương đồng. Cây phát sinh loài được xây dựng dựa trên thuật toán Clustalw với giá trị bootstrap 1000.

Khả năng ức chế *S. agalactiae* gây bệnh thân đen trên cá Sặc rằn của chủng *B. subtilis* được tuyển chọn trong điều kiện thực nghiệm

Thí nghiệm đánh giá khả năng ức chế vi khuẩn *S. agalactiae* trong điều kiện thực nghiệm được thực hiện trong 14 ngày với nước nuôi có giá trị pH 6,5 – 7, nồng độ oxy hòa tan (DO) dao động từ 7,9 – 9,5 và nhiệt độ từ 29 – 30°C.

Sau 14 ngày theo dõi thí nghiệm, kết quả cho thấy có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ cá sống giữa các nghiệm thức, trong đó tất cả cá ở nghiệm thức đối chứng âm có tỷ lệ sống 100%, cá ăn và hoạt động bình thường. Các nghiệm thức còn lại, cá bắt đầu chết vào ngày thứ 2 với các dấu hiệu bệnh lý như da có chấm đen, bụng phình to, mắt lồi đục. Đối với nghiệm thức đối chứng dương, cá bắt đầu chết vào ngày thứ 2 và

kéo dài đến ngày thứ 11 với tỷ lệ sống của cá còn 41,7% sau đó cá ngưng chết đến khi kết thúc thí nghiệm. Ở nghiệm thức 1, cá chết đến ngày thứ 8 và tỷ lệ sống của cá còn 60%, thấp hơn so với nghiệm thức 2 và 3 có tỷ lệ sống lần lượt đạt 76,7% và 81,7%, cá dừng chết sau 5 ngày gây cảm nhiễm (biểu đồ hình 4). Như vậy, chủng tổ loài *B. subtilis* phân lập và tuyển chọn được có khả năng ức chế *S. agalactiae* trong điều kiện thực nghiệm giúp tăng tỷ lệ sống của cá đã bị nhiễm vi khuẩn gây bệnh thân đen và mật độ của *B. subtilis* được xử lý tỷ lệ thuận với tỷ lệ sống của cá đã bị nhiễm khuẩn bệnh. Kết quả nghiên cứu của Wing-Keong Ng và đồng tác giả (2014) cũng như của Zhu và đồng tác giả (2019) cho thấy khi bổ sung *B. subtilis* vào thức ăn cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) sẽ làm tăng khả năng miễn dịch, cá có thể kháng lại bệnh do vi khuẩn *S. agalactiae* gây ra và cải thiện sự phát triển của cá.



Hình 4. Tỷ lệ cá sống qua 14 ngày cảm nhiễm.

KẾT LUẬN

Loài *Bacillus subtilis* được phân lập từ mẫu gan của cá Sặc rằn khỏe nuôi tại xã Láng Biển, huyện Tháp Mười, tỉnh Đồng Tháp có khả năng ức chế vi khuẩn *S. agalactiae* gây bệnh thân đen trên cá Sặc rằn, chúng làm tăng tỷ lệ sống của cá đã bị nhiễm khuẩn. Loài *B. subtilis* này cần

có nghiên cứu về tối ưu hóa môi trường và các điều kiện nuôi cấy thích hợp để có thể đưa vào ứng dụng tạo chế phẩm phòng, kháng bệnh thân đen trên cá Sặc rằn, hạn chế sử dụng thuốc kháng sinh, giúp nâng cao chất lượng và giá trị của cá nuôi thương phẩm.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện từ

một phần kinh phí được cấp của đề tài hợp tác cấp Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với Ủy ban Nhân dân tỉnh Đồng Tháp, mã số đề tài UDNGP.02/18-19.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

FAO (2020) Species fact sheets *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910). <http://www.fao.org/fishery/species/3321/en>, truy cập ngày 12/04/2020.

Galindo AB (2004) *Lactobacillus plantarum* 44A as a live feed supplement for freshwater fish. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands: 131.

Hossain MN, Rahman MM (2014) Antagonistic activity of antibiotic producing *Streptomyces* sp. against fish and human pathogenic bacteria. *Braz Arch Biol Technol* 57(2): 233–237.

Iman MKA, Wafaa TA, Elham SA, Mohammad MNA, El-Shafei K, Osama MS, Gamal AI, Zeinab IS, El-Sayed HS (2013) Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic in aquaculture: emphasis on growth performance and innate immunity. *J Appl Sci Res* 9(1): 572–582.

Lê Thị Hải Yến, Nguyễn Đức Hiền (2016) Khảo sát đặc tính probiotic các chủng vi khuẩn *Bacillus subtilis* phân lập tại các tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ* 2: 26–32.

Minas K, McEwan NR, Newbold CJ, Scott KP (2011) Optimization of high throughput CTAB-based protocol for the extraction of qPCR-grade DNA from rumen fluid, plant and bacterial pure

cultures. *FEMS Microbiol Lett* 325(2): 162–169.

Ng WK., Kim YC, Romano N, Koh CB, Yang SY (2014) Effects of dietary probiotics on the growth and feeding efficiency of red hybrid tilapia, *Oreochromis* sp., and subsequent resistance to *Streptococcus agalactiae*. *J Appl Aquacult* 26(1): 22–31.

Ngô Thị Ngọc Trân, Nguyễn Trọng Nghĩa, 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* 42: 48–55.

Phan Thị Lệ Hoa, Từ Thanh Dung (2014) Nghiên cứu bệnh thân đen trên cá Sặc rằn (*Trichogaster pectoralis*) nuôi thâm canh của tỉnh Đồng Tháp. Luận văn tốt nghiệp Đại học, Trường Đại học Cần Thơ.

Tu TD, Haesebrouck F, Nguyen AT, Sorgeloos P, Baele M, Decostere A (2008) Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of bacillary necrosis of Pangasianodon hypophthalmus in Vietnam. *Microb Drug Resist* 14: 311–316.

Vaseeharan B, Ramasamy P (2003) Control of pathogenic *Vibrio* spp. by *Bacillus subtilis* BT23, a possible probiotic treatment for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Lett Appl Microbiol* 36: 83–87.

Zhu C, Yu L, Liu W, Jiang M, He S, Yi G, Wen H, Liang X (2019) Dietary supplementation with *Bacillus subtilis* LT3-1 enhance the growth, immunity and disease resistance against *Streptococcus agalactiae* infection in genetically improved farmed tilapia *Oreochromis niloticus*. *Aquac Nutr* 25(6): 1241–1249.

ISOLATION AND SELECTION OF BACTERIA INHIBITING *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE* CAUSING DARK-BODY DISEASE ON SNAKESKIN GOURAMI FISH (*TRICHOGASTER PECTORALIS*)

Le Thi Anh Hong¹, Pham Thi Minh Ngoc^{1,2}, Duong Khanh², Vo Van Tuan², Nguyen Hoang Dung¹

¹Institute of Tropical Biology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Nong Lam University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Streptococcus agalactiae is one of the microbial pathogens causing the dark-body disease on

snakeskin gourami fish (*Trichogaster pectoralis*) that affects the growth and quality of fish. This research aimed to isolate and select bacteria inhibiting *S. agalactiae* which are able to use for controlling pathogenic bacteria instead of antibiotics. Fourteen bacteria strains were isolated and screened from healthy fishes, sediment and water samples at fish ponds in Dong Thap province. Among these strains, L7 strain showed the highest inhibition ability with the clear zone diameter was 9,3 mm. The results of the 16S rRNA sequence analysis indicated that the L7 strain belonged to *Bacillus subtilis*. The experiment to evaluate the inhibition capacity and fish disease control of selected *B. subtilis* in experimental conditions was conducted by challenging fish with *S. agalactiae*. Fishes in the control treatment was infected with *S. agalactiae* at 10^6 CFU/mL had survival rate 41,7%. The experimental treatments NT1, NT2, NT3 which were treated with *B. subtilis* at concentrations of 10^5 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, and 10^7 CFU/mL gave higher survival rates compared with the non-treated control, with the rates of 60%, 76,7%, and 81,7%, respectively. These results revealed that the isolated *B. subtilis* is potential used in control dark-body disease on snakeskin gourami fish.

Keywords: *Bacillus subtilis*, dark-body disease, snakeskin gourami, *Streptococcus agalactiae*, *Trichogaster pectoralis*.