

HOẠT ĐỘNG ĐỐI KHÁNG CỦA CHỦNG *Bacillus amyloliquefaciens* B894 VỚI VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*

Lê Lưu Phương Hạnh¹, Nguyễn Hoàng Chi Mai², Trần Ngọc Phương Linh³,
Lê Văn Hậu¹, Nguyễn Đăng Quân¹, Ngô Huỳnh Phương Thảo¹

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, ba thành phần khác nhau của dịch nuôi cấy vi khuẩn (gồm: toàn bộ sản phẩm tế bào - whole cell product (WCP), sản phẩm nội bào - intracellular product (ICP) và sản phẩm ngoại bào - extracellular product (ECP) của *Bacillus amyloliquefaciens* B894 đã được kiểm tra hoạt tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh *Edwardsiella ictaluri* và *Aeromonas hydrophila*. Ngoại trừ ICP, cả WCP và ECP đều đối kháng với cả 2 vi khuẩn gây bệnh trong môi trường theo thời gian. Dịch nuôi cấy WCP có hiệu quả trong việc ức chế sự phát triển của 2 vi khuẩn gây bệnh trên cả môi trường thạch và lỏng. Kết quả khảo sát trên môi trường thạch cho thấy đường kính vòng vô khuẩn đạt $16,3 \pm 0,6$ mm (*A. hydrophila*) và $29,7 \pm 0,6$ mm (*E. ictaluri*). Khi đồng nuôi cấy *B. amyloliquefaciens* B894 và 2 vi khuẩn gây bệnh với nồng độ bằng hoặc lớn hơn 10 lần thì *B. amyloliquefaciens* B894 kìm hãm hoàn toàn sự phát triển của *E. ictaluri* sau 15 giờ và *A. hydrophila* sau 36 giờ. Dịch ECP của *B. amyloliquefaciens* B894 chỉ thể hiện hoạt tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh khi bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi cấy lỏng. Sau 24 giờ nuôi cấy không còn thấy sự hiện diện của 2 vi khuẩn gây bệnh trong môi trường. Đây là cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo để ứng dụng *B. amyloliquefaciens* B894 trong nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: Thành phần tế bào, hoạt tính đối kháng, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phương pháp phòng và trị bệnh truyền thống trước đây trên cá tra đã lạm dụng thuốc kháng sinh và hóa chất diệt khuẩn, dẫn đến việc gia tăng vi khuẩn gây bệnh kháng kháng sinh. Kiểm soát sinh học bằng cách sử dụng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng được kỳ vọng sẽ trở thành một phương pháp thay thế để phòng ngừa và kiểm soát các bệnh do vi khuẩn (Afrin, 2019).

Trong mối quan hệ đối kháng, một số vi sinh vật gián tiếp ức chế các tác nhân gây bệnh hoặc làm giảm sự phát triển của chúng bằng cách thay đổi pH, áp suất thẩm thấu và sức căng bề mặt. Một số vi sinh vật khác lại có thể trực tiếp hạn chế sự phát triển của các vi sinh vật khác thông qua sản xuất bacteriocin, kháng sinh, các hợp chất gây độc hoặc hợp chất kháng khuẩn (Afrin, 2019).

Các nhà khoa học đã phân lập nhiều chủng vi sinh vật có lợi thuộc chi *Bacillus* như *B. subtilis* (Das et al., 2005), *B. circulans* (Ghosh et al., 2014), *B. atrophaeus* (Shelar, 2012) ... có khả năng ức chế các tác nhân gây bệnh trong thủy sản, trong đó có *B. amyloliquefaciens* (Afrin, 2019). *B. amyloliquefaciens* là vi khuẩn không gây bệnh, có quan hệ di truyền gần với *B. subtilis*. Loài này có khả năng tổng hợp các

chất chuyển hóa thứ cấp với hoạt tính kháng khuẩn (Afrin, 2019).

Nghiên cứu của Haipeng Cao (2011), đã chứng minh rằng các sản phẩm ngoại bào chủng *B. amyloliquefaciens* G1 có khả năng kháng *A. hydrophila* gây bệnh trên lươn. Dịch ngoại bào ECP có thể ngăn cản sự phát triển của *A. hydrophila*, tạo rõ vòng vô khuẩn trên đĩa nuôi cấy (Haipeng Cao, 2011).

Das và cộng tác viên (2005) khi khảo sát tác động đối kháng của các thành phần tế bào từ vi khuẩn *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. putida* đối với chủng *A. hydrophila* cũng thấy rằng dịch nuôi cấy gồm toàn bộ sản phẩm tế bào (WCP), sản phẩm tế bào bị giết bằng nhiệt (HK WCP), dịch ngoại bào (ECP) và dịch nội bào (ICP) của các vi khuẩn này đều ức chế sự phát triển của *A. hydrophila*. Nghiên cứu còn cho thấy mức độ kháng lại *A. hydrophila* của 4 thành phần này cao hơn so với kháng sinh (như acid nalidixic, chloramphenicol, oxytetracycline, gentamycin ...). Năm 2017, khi nghiên cứu đặc tính và cơ chế đối kháng của chủng *B. pumilus* H2 đối với vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh trên cá, Xi-Yan và cộng tác viên đã xác định rằng các chất kháng *Vibrio* nằm trong dịch ngoại bào, với nồng độ ức chế tối thiểu dao động từ 0,5 đến 64 µg/ml (Xi-Yan, 2017).

¹ Phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ Sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

² Trường Đại học Khoa học Tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh

³ Trường Đại học Tôn Đức Thắng Thành phố Hồ Chí Minh

Ở nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894 được phân lập ở Phú Thù, tỉnh Cần Thơ, vi khuẩn này đối kháng với 2 tác nhân gây bệnh *E. ictaluri* và *A. hydrophila*. Khảo sát bằng phương pháp giếng khuếch tán cho thấy vòng vô khuẩn đo được là 29 mm (đối với *E. ictaluri*) và 15 mm (đối với *A. hydrophila*). Nghiên cứu đưa ra những thông tin chi tiết hơn về hoạt tính, mức độ, thời gian đối kháng của chủng *B. amyloliquefaciens* B894.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894 có hoạt tính đối kháng được phân lập từ mẫu bùn ở Cần Thơ.

Chủng vi khuẩn gây bệnh *E. ictaluri* 5H và *A. hydrophila* AG1 có độc lực mạnh được lưu trữ tại phòng CNSH Thủy sản, Trung tâm CNSH thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chuẩn bị các thành phần tế bào

Ba thành phần tế bào khác nhau được chuẩn bị dựa theo mô tả của Das và cộng tác viên từ chủng *B. amyloliquefaciens* B894, gồm: WCP, ICP và ECP. Chủng *B. amyloliquefaciens* B894 được nuôi cấy trong 150 mL môi trường Brain heart infusion (BHI), ở 37°C, trong 24 giờ. Sinh khối được chia thành từng ống 50 mL, và được sử dụng để thu nhận các thành phần tế bào (Das, 2005).

- Thu nhận WCP: Sinh khối vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894 được thu nhận sau 24 giờ nuôi cấy, ly tâm ở 2500 xg trong 20 phút ở 4°C, và rửa 2 lần với PBS 1X pH 7,2 (gồm: 8 g NaCl, 200 mg KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ và 245 g KH₂PO₄) và huyền phù lại với PBS theo 1/2 thể tích ban đầu. Dịch huyền phù được sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

- Thu nhận ECP:

Đối với thí nghiệm trên đĩa thạch, thu nhận phần dịch nổi của vi khuẩn sau 24 giờ nuôi cấy bằng cách ly tâm và lọc qua màng lọc 0,45 µm để loại bỏ hoàn toàn phần cặn vi khuẩn còn sót lại sau ly tâm. Dịch nổi sẽ được sử dụng để khảo sát hoạt tính đối kháng với 2 tác nhân gây bệnh trên đĩa thạch và trong môi trường lỏng.

Đối với thí nghiệm khảo sát hoạt tính của ECP vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894 theo thời gian, ECP được thu theo từng mốc thời gian 0h, 4h, 8h, 12h, 16h, 20h và 24h (kí hiệu lần lượt ECP0, ECP4, ECP8, ECP12, ECP16, ECP20, ECP24) và lọc qua màng lọc 0,45 µm.

- Thu nhận ICP

Sau 24 giờ nuôi cấy, sinh khối vi khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm được rửa 2 lần với PBS 1X (pH 7,2) và được huyền phù trong PBS (2% so với thể tích ban đầu). Sau đó, dịch khuẩn sẽ được phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm với tần số 50Hz trong 10 phút, và lọc qua màng lọc 0,45 µm để sử dụng cho thí nghiệm khảo sát hoạt tính đối kháng.

2.2.2. Khảo sát hoạt tính đối kháng của các thành phần tế bào vi khuẩn

Các phương pháp trong nghiên cứu được thực hiện và điều chỉnh dựa theo mô tả của Sabina (2016).

a) Phương pháp giếng khuếch tán trên môi trường thạch

Vi khuẩn *E. ictaluri* 5H và *A. hydrophila* AG1 được nuôi cấy trên môi trường BHI lỏng, sau 24 giờ sẽ được thu nhận và trải đều trên đĩa petri chứa môi trường MHA với mật độ khoảng 5×10^5 CFU/mL. Tạo 4 giếng với đường kính 8 mm trên mặt thạch. Hút 30 µl các thành phần tế bào WCP, ECP và ICP đã chuẩn bị cho lần lượt vào các giếng và sử dụng dịch vi khuẩn không qua ly tâm (bao gồm cả dịch nổi và sinh khối tế bào) để cho vào giếng đối chứng. Quan sát kết quả vòng đối kháng sau 24 giờ đối với *A. hydrophila* và 48 giờ đối với *E. ictaluri*.

b) Phương pháp đồng nuôi cấy trên môi trường lỏng

Lần lượt chuẩn bị môi trường BHI lỏng để đồng nuôi cấy các thành phần tế bào *B. amyloliquefaciens* B894 với 2 tác nhân gây bệnh.

Dịch ICP và ECP được bổ sung vào môi trường nuôi cấy theo tỷ lệ 3(ICP) : 7(BHI) và 1(ECP) : 1(BHI). Trong khi đó, WCP được bổ sung vào môi trường BHI lỏng với nồng độ ban đầu khoảng 10^5 CFU/mL. Sau đó, vi khuẩn *E. ictaluri* 5H và *A. hydrophila* AG1 lần lượt được bổ sung vào trong môi trường với mật độ ban đầu khoảng 10^5 CFU/mL.

Sau 24 giờ, mật độ của 2 vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong môi trường sẽ được kiểm tra bằng phương pháp trải đĩa và đếm khuẩn lạc. Dịch vi khuẩn được pha loãng theo hệ số 10 và trải lần lượt trên các môi trường BHI có bổ sung chloramphenicol (50 µg/mL) và môi trường Rimler-Shotts (RS).

2.2.3. Khảo sát ảnh hưởng của thời gian thu nhận ECP vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894 đến hoạt tính đối kháng

Ở thí nghiệm này, ECP của *B. amyloliquefaciens* B894 được thu nhận tại các mốc thời gian 0, 4, 8, 12, 16, 20 và 24 giờ được trình bày ở mục 2.2.2 và được bổ sung vào môi trường BHI lỏng theo tỷ lệ 1(ECP) : 1(BHI). Sử dụng môi trường có bổ sung ECP để nuôi cấy dịch vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* ở mật độ ban đầu khoảng 10^5 CFU/mL. Sau 24 giờ, mật độ *E. ictaluri* và *A. hydrophila* được kiểm tra bằng phương pháp trải đĩa và đếm khuẩn lạc.

2.2.4. Khảo sát ảnh hưởng của mật độ *B. amyloliquefaciens* B894 đến hoạt tính đối kháng

Các mốc thời gian khảo sát trong thí nghiệm được thực hiện dựa theo những kết quả nghiên cứu trước đây của nhóm nghiên cứu (kết quả không được trình bày trong bài báo này).

a) Ảnh hưởng của mật độ *B. amyloliquefaciens* B894 đến hoạt tính đối kháng với *E. ictaluri*

Thí nghiệm với *E. ictaluri* 5H được chia thành 9 nghiệm thức, trong đó có 4 nghiệm thức đồng nuôi cấy giữa *B. amyloliquefaciens* B894 với *E. ictaluri* 5H và 5 nghiệm thức đối chứng.

Mật độ *E. ictaluri* được sử dụng trong thí nghiệm là 10^5 CFU/mL. Dịch vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894 được bổ sung vào môi trường BHI lỏng với mật độ từ 10^3 CFU/mL đến 10^6 CFU/mL. Mật độ sử dụng cụ thể được mô tả theo các nghiệm thức như sau: TNE1: 10^3 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894 + 10^5 CFU/mL *E. ictaluri* 5H; TNE2: 10^4 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894 + 10^5 CFU/mL *E. ictaluri* 5H; TNE3: 10^5 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894 + 10^5 CFU/mL *E. ictaluri* 5H; TNE4: 10^6 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894 + 10^5 CFU/mL *E. ictaluri* 5H; ĐCB1: 10^3 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894; ĐCB2: 10^4 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894; ĐCB3: 10^5 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894; ĐCB 4: 10^6 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894; DCE: 10^5 CFU/mL *E. ictaluri* 5H.

Dựa vào hình thái khuẩn lạc đặc trưng, mật độ vi khuẩn *E. ictaluri* 5H và *B. amyloliquefaciens* 894 được kiểm tra theo các mốc thời gian 0, 5, 10, 15, 20 và 25 giờ lần lượt trên môi trường BHI (50 µg/mL chloramphenicol) và Tryptone Soya agar (TSA).

b) Ảnh hưởng của mật độ *B. amyloliquefaciens* B894 đến hoạt tính đối kháng với *A. hydrophila*

Thí nghiệm với *A. hydrophila* AG1 được chia làm 7 nghiệm thức, với 3 nghiệm thức đồng nuôi cấy giữa *B. amyloliquefaciens* B894 và 4 nghiệm thức đối chứng.

Mật độ *A. hydrophila* được sử dụng là 105 CFU/mL. Dịch vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894 được bổ sung vào môi trường BHI lỏng với mật độ từ 10^4 CFU/mL đến 10^6 CFU/mL. Mật độ sử dụng được mô tả cụ thể theo các nghiệm thức sau: TNA1: 10^4 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894 + 10^5 CFU/mL *A. hydrophila* AG1; TNA2: 105CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894 + 10^5 CFU/mL *A. hydrophila* AG1; TNA3: 10^6 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894 + 10^5 CFU/mL *A. hydrophila* AG1; ĐCB1: 10^4 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894; ĐCB2: 10^5 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894; ĐCB3: 10^6 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894; ĐCA: 10^5 CFU/mL *A. hydrophila* AG1.

Dựa vào hình thái khuẩn lạc đặc trưng, mật độ vi khuẩn *A. hydrophila* AG1 và *B. amyloliquefaciens* B894 được kiểm tra theo các mốc thời gian 0, 12, 24, 36 và 48 giờ lần lượt trên các môi trường RS và TSA.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu mật độ vi khuẩn thu được ở các nội dung thí nghiệm sẽ được tính trung bình và vẽ đồ thị bằng chương trình Excel.

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 8 với thuật toán ANOVA.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

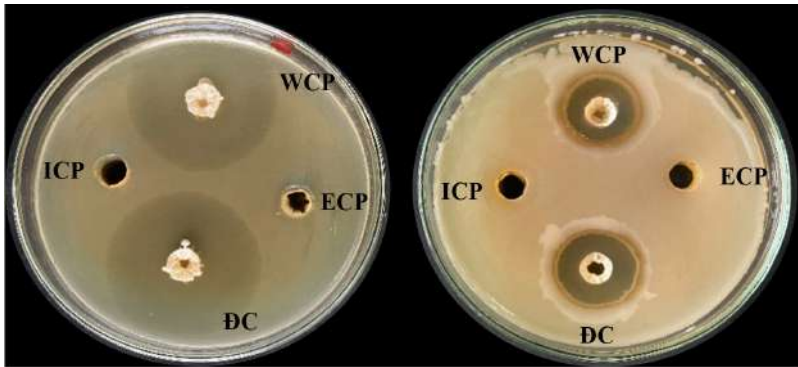
- Thời gian nghiên cứu: Từ tháng 01 đến tháng 12 năm 2020.

- Địa điểm nghiên cứu: Các thí nghiệm được thực hiện tại phòng CNSH Thủy Sản, Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Hoạt tính đối kháng của các thành phần tế bào vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894 với *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

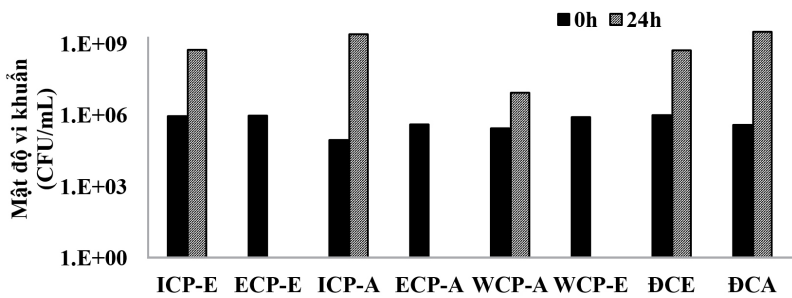
Kết quả khảo sát hoạt tính đối kháng của 3 thành phần tế bào WCP, ECP và ICP với *E. ictaluri* 5H và *A. hydrophila* AG1 bằng phương pháp giếng khuếch tán cho thấy chỉ có WCP tạo được vòng vô khuẩn. Kích thước vòng vô khuẩn với *E. ictaluri* là $29,7 \pm 0,6$ mm và *A. hydrophila* là $16,3 \pm 0,6$ mm (Hình 1).



Hình 1. Hoạt tính đối kháng của *B. amyloliquefaciens* B894 với *E. ictaluri* (A) và *A. hydrophila* (B) bằng phương pháp giếng khuếch tán

Tuy nhiên, khi sử dụng phương pháp nuôi cấy lỏng, việc bổ sung ECP vào môi trường nuôi ảnh hưởng đến mật độ của vi khuẩn gây bệnh. Mật độ

vi khuẩn *E. ictaluri* 5H và *A. hydrophila* AG1 thay đổi so với nuôi cấy trong môi trường đối chứng (Hình 2).

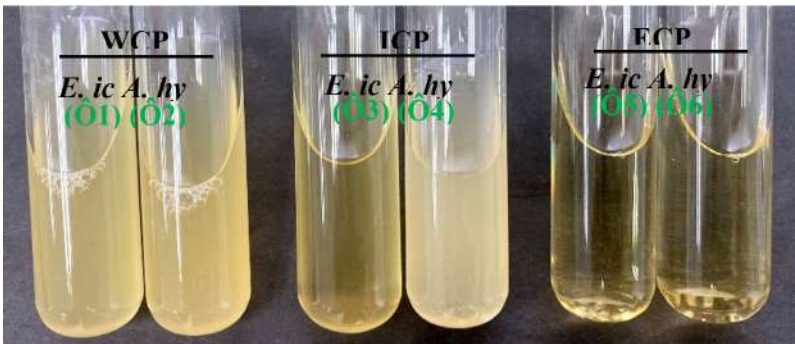


Hình 2. Đồ thị về sự thay đổi mật độ của *A. hydrophila* và *E. ictaluri* nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ICP và ECP của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894

Ghi chú: ICP-E, ICP-A: mật độ của *E. ictaluri* 5H, *A. hydrophila* AG1 trong môi trường có ICP; ECP-E, ECP-A: mật độ của *E. ictaluri* 5H, trong môi trường có ECP; WCP-E, WCP-A: mật độ của *E. ictaluri* 5H, *A. hydrophila* AG1 trong môi trường có WCP; ĐCE, ĐCA: mật độ của *E. ictaluri*, *A. hydrophila* AG1 trong môi trường BHI đối chứng.

Từ nồng độ ban đầu của *E. ictaluri* 5H là $9,5 \times 10^5$ CFU/mL và *A. hydrophila* AG1 $4,25 \times 10^5$ CFU/mL, sau 24 giờ nuôi cấy không còn thấy sự xuất hiện của vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong môi trường dinh dưỡng có bổ sung ECP của *B. amyloliquefaciens*

B894. Quan sát cho thấy, dịch nuôi cấy *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong môi trường có ECP sau 24 giờ vẫn trong suốt, không thấy có sự phát triển của vi khuẩn trong môi trường (Hình 3).



Hình 3. Dịch nuôi cấy vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong môi trường BHI có bổ sung WCP, ICP và ECP của *B. amyloliquefaciens* B894

Ghi chú: Ô1, Ô2: vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong môi trường có WCP; Ô3, Ô4: vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong môi trường có ICP; Ô5, Ô6: vi khuẩn *E. ictaluri* và *A. hydrophila* trong môi trường có ECP.

Riêng với ICP, không thấy thể hiện hoạt tính đối kháng với hai tác nhân gây bệnh khi khảo sát bằng cả phương pháp nuôi cấy trong môi trường lỏng và môi trường thạch. Sau 24 giờ, mật độ *E. ictaluri* 5H trong môi trường có bổ sung ICP tăng từ 9×10^5 CFU/mL lên $5,65 \times 10^8$ CFU/mL, và *A. hydrophila* tăng từ $4,2 \times 10^5$ CFU/mL lên $4,6 \times 10^9$ CFU/mL, tương đương với vi khuẩn được nuôi trong môi trường dinh dưỡng không có bổ sung ICP.

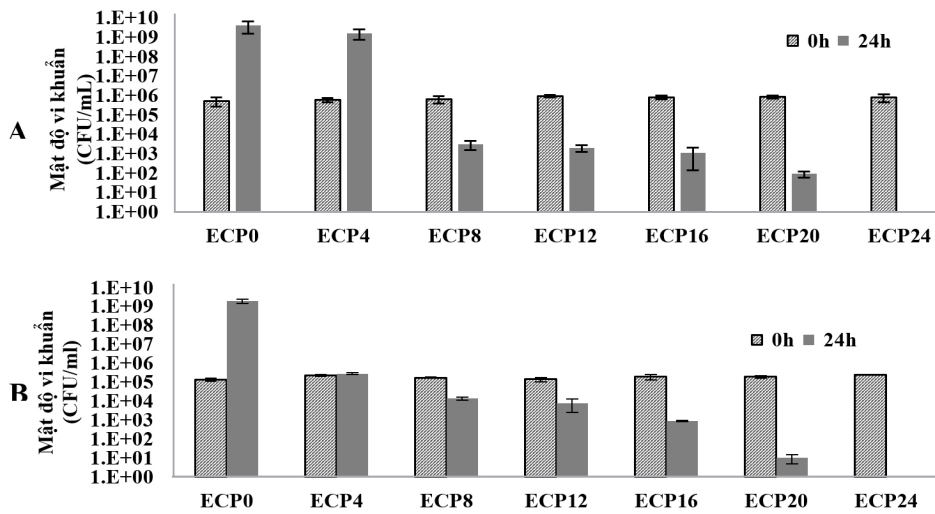
3.2. Ảnh hưởng của thời gian thu nhận ECP của *B. amyloliquefaciens* B894 đến hoạt tính đối kháng

Dịch ECP của *B. amyloliquefaciens* B894 có tác động khác nhau đến sự phát triển của hai vi khuẩn gây bệnh tùy thuộc vào mốc thời gian thu nhận (Hình 4).

Đối với *A. hydrophila* AG1, dịch ECP8 thu ở mốc 8h bắt đầu có ảnh hưởng và làm giảm mật độ *A. hydrophila* AG1 từ $6,5 \times 10^5$ CFU/mL xuống còn

3×10^3 CFU/mL. Với dịch ECP20 làm giảm mật độ vi khuẩn từ $8,5 \times 10^5$ CFU/mL xuống chỉ còn 9×10^1 CFU/mL. Và khi bổ sung ECP24 vào môi trường thì ức chế hoàn toàn sự phát triển *A. hydrophila* AG1 sau thời gian nuôi cấy ($p = 0,0013$) (Hình 4A).

Sự phát triển của vi khuẩn *E. ictaluri* 5H cũng bị kiểm soát tương tự với *A. hydrophila* AG1 khi nuôi trong môi trường có bổ sung ECP của *B. amyloliquefaciens* B894 được thu ở các mốc thời gian khác nhau. Dịch ECP4 thu ở mốc 4 giờ đã bắt đầu ức chế sự phát triển của vi khuẩn *E. ictaluri* 5H, mật độ vi khuẩn thu được là $2,85 \times 10^5$ CFU/mL, không tăng trưởng so với mật độ ban đầu là $2,3 \times 10^5$ CFU/mL. Khi sử dụng ECP20 bổ sung vào môi trường nuôi cấy thì mật độ vi khuẩn giảm còn $1,0 \times 10^1$ CFU/mL và với ECP24 thì sự phát triển của vi khuẩn *E. ictaluri* bị kìm hãm hoàn toàn sau 24 giờ ($p < 0,0001$) (Hình 4B).



Hình 4. Đồ thị về sự thay đổi mật độ của *A. hydrophila* (A) và *E. ictaluri* (B) nuôi cấy trong môi trường có bổ sung ECP của vi khuẩn *B. amyloliquefaciens* B894 theo thời gian

3.3. Ảnh hưởng của mật độ *B. amyloliquefaciens* B894 đến hoạt tính đối kháng với *E. ictaluri* và *A. hydrophila*

Khi thay đổi mật độ của *B. amyloliquefaciens* B894 thì hoạt tính đối kháng của nó ảnh hưởng đến thời gian và tốc độ phát triển của *E. ictaluri* 5H và *A. hydrophila* AG1, thể hiện qua sự thay đổi mật độ của vi khuẩn theo thời gian (Hình 5 và 6).

Khi sử dụng *B. amyloliquefaciens* B894 với mật độ dao động từ 10^3 đến 10^5 CFU/mL trong môi trường đồng nuôi cấy thì mật độ *E. ictaluri* 5H từ 10^5 CFU/mL có dấu hiệu giảm dần, và ức chế hoàn toàn *E. ictaluri* 5H sau 20 giờ. Khi tăng mật độ của *B. amyloliquefaciens* B894 lên 10^6 CFU/mL thì không

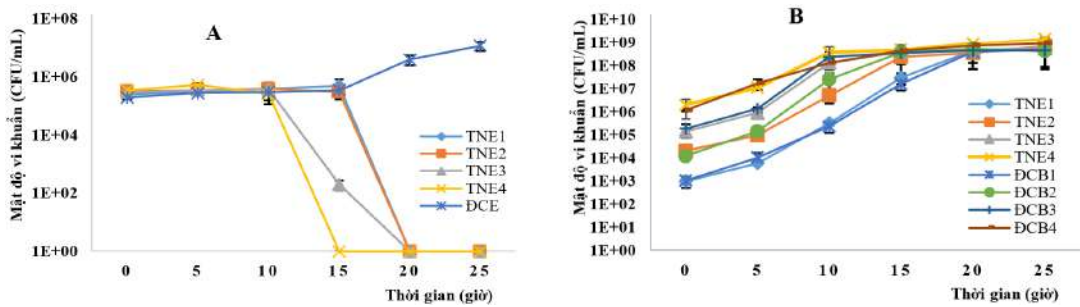
thấy sự hiện diện của *E. ictaluri* 5H sau 15 giờ trong môi trường (Hình 5A).

Trong khi đó, chủng *B. amyloliquefaciens* B894 vẫn sinh trưởng và phát triển bình thường trong môi trường đồng nuôi cấy. Sau 25 giờ khảo sát, nồng độ của B894 đạt từ $5,7 \times 10^8$ đến $1,4 \times 10^9$ CFU/mL (Hình 5B).

Tốc độ phát triển của *A. hydrophila* AG1 cũng bị ức chế tương tự *E. ictaluri* 5H khi đồng nuôi cấy với *B. amyloliquefaciens* B894 ở các nồng độ khác nhau (Hình 6). Với nồng độ 3×10^4 CFU/mL, *B. amyloliquefaciens* B894 không ảnh hưởng nhiều đến tốc độ sinh trưởng và phát triển của *A. hydrophila* AG1 2×10^5 CFU/mL. Sau 48 giờ nuôi cấy, mật độ

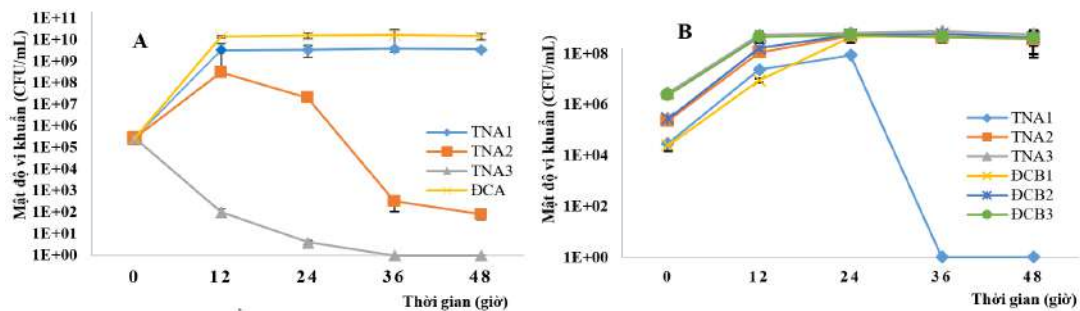
của *A. hydrophila* AG1 tăng từ $2,5 \times 10^5$ CFU/mL lên $3,45 \times 10^9$ CFU/mL (Hình 6A), chỉ thấp hơn 4 lần so với đối chứng là $1,4 \times 10^{10}$ CFU/mL. Ngược lại, trong cùng nghiệm thức TNA1, mật độ vi khuẩn

B. amyloliquefaciens lại bị *A. hydrophila* AG1 ức chế, sau 36 giờ mật độ của *B. amyloliquefaciens* B894 đã giảm hoàn toàn (Hình 6B).



Hình 5. Đồ thị về sự thay đổi mật độ của *E. ictaluri* (A) và *B. amyloliquefaciens* B894 (B) trong dịch đồng nuôi cấy

Ghi chú: TNE1, TNE2, TNE3, TNE4: thí nghiệm 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894 + 10^5 CFU/mL *E. ictaluri* 5H; DCB1, DCB2, DCB3, DCB4: đối chứng *B. amyloliquefaciens* 894 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU/mL; DCE: đối chứng *E. ictaluri* 5H 10^5 CFU/mL.



Hình 6. Sự thay đổi mật độ của *A. hydrophila* (A) và *B. amyloliquefaciens* B894 (B) trong dịch đồng nuôi cấy

Ghi chú: TNA1, TNA2, TNA3: thí nghiệm 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU/mL *B. amyloliquefaciens* 894 + 10^5 CFU/mL *A. hydrophila* AG1; DCB1, DCB2, DCB3: đối chứng *B. amyloliquefaciens* 894 10^4 , 10^5 , 10^6 CFU/mL; DCA: 10^5 CFU/mL *A. hydrophila* AG1.

Khi tăng nồng độ sử dụng của *B. amyloliquefaciens* B894 lên khoảng $2,3 \times 10^5$ CFU/mL, tương đương với nồng độ ban đầu của *A. hydrophila* là $2,5 \times 10^5$ CFU/mL, thì nồng độ của *A. hydrophila* bắt đầu giảm dần theo thời gian. Sau 48 giờ, nồng độ của *A. hydrophila* trong môi trường đồng nuôi cấy giảm còn $8,0 \times 10^1$ CFU/mL. Và với nồng độ *B. amyloliquefaciens* B894 là $2,9 \times 10^6$ CFU/mL cao hơn 10 lần so với nồng độ *A. hydrophila* ban đầu thì sau 36 giờ đã không còn thấy sự hiện diện của *A. hydrophila* trong dịch nuôi cấy (Đồ thị 4A).

Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng vi khuẩn *Bacillus* spp. có thể Trước đây, có rất nhiều nghiên cứu chứng minh vi khuẩn *Bacillus* có thể tiết vào môi trường các hoạt chất có tính sát khuẩn hoặc kim hãm các vi khuẩn trong môi trường nuôi trồng thủy sản (Das, 2014).

Hoạt tính đối kháng của các thành phần WCP và ECP của *B. amyloliquefaciens* B894 có thể được

xác định bởi sự xuất hiện của vòng vô khuẩn xung quanh giếng khuếch tán và sự suy giảm mật độ của vi khuẩn gây bệnh theo thời gian.

Một trong những phương thức hoạt động phổ biến của chủng vi khuẩn probiotic là sản xuất các hợp chất ức chế các tác nhân gây bệnh. Nghiên cứu trước đây trên *B. subtilis* VSG1 cũng cho thấy các thành phần tế bào WCP, ICP và ECP của chủng đều thể hiện hoạt tính đối kháng với 6 chủng thuộc nhóm *A. hydrophila*, bằng cách tạo vòng vô khuẩn xung quanh giếng thạch với đường kính lớn hơn 40 mm (Giri, 2011). Hay chủng *B. subtilis* AN11 cũng cho thấy thành phần WCP của vi khuẩn ức chế sự phát triển của các vi khuẩn gây bệnh trên thủy sản, trong đó có *E. tarda*, khi bổ sung 30 μ L WCP vào giếng khuếch tán. Tuy nhiên, ECP của *B. subtilis* AN11 cũng không thể hiện được hoạt tính đối kháng của mình khi được khảo sát hoạt tính bằng phương pháp giếng khuếch tán (Das, 2014). Thành

phần WCP và ECP của chủng *B. amyloliquefaciens* cũng cho thấy khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn *S. rubidaea* cũng bằng cách tạo được vòng vô khuẩn trên môi trường thạch (Afrin, 2019).

Những kết quả trên cho thấy rằng các thành phần tế bào của vi khuẩn *Bacillus* spp. ức chế được các tác nhân gây bệnh, tuy nhiên tùy thuộc vào từng vi khuẩn, cũng như nồng độ sử dụng mà thành phần tế bào nào có hoạt tính đối kháng.

IV. KẾT LUẬN

Chủng *B. amyloliquefaciens* B894 có khả năng ức chế *E. ictaluri* và *A. hydrophila* ở 2 dạng thành phần tế bào ECP và WCP. Dịch ECP làm chậm sự phát triển của *E. ictaluri* và *A. hydrophila* lần lượt sau 4 và 8 giờ thu nhận. Dịch ECP được thu nhận sau 24 giờ sẽ ức chế hoàn toàn sự phát triển của vi khuẩn gây bệnh trong thời gian nuôi cấy.

Trong khi đó, chủng *B. amyloliquefaciens* B894 ở dạng WCP ức chế hoàn toàn sự phát triển của *E. ictaluri* (sau 15 giờ) và *A. hydrophila* (sau 36 giờ) khi được sử dụng với nồng độ bằng hoặc gấp 10 lần so với nồng độ của các tác nhân gây bệnh.

Những kết quả này là cơ sở cho việc sử dụng chủng *B. amyloliquefaciens* B894 để phát triển thành chế phẩm sinh học để kiểm soát bệnh gan thận mủ và xuất huyết cho cá Tra trong quá trình nuôi.

LỜI CẢM ƠN

Các kết quả nghiên cứu trong bài báo này đều thuộc nhiệm vụ khoa học công nghệ “Phân lập các chủng vi khuẩn có hoạt tính đối kháng với vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ và xuất huyết trên cá tra ở đồng bằng sông Cửu Long” do Sở Khoa học và Công nghệ Tp. HCM cấp kinh phí.

Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* B894 against *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*

Le Luu Phuong Hanh, Nguyen Hoang Chi Mai, Tran Ngoc Phuong Linh,
Le Van Hau, Nguyen Dang Quan, Ngo Huynh Phuong Thao

Abstract

In this study, three different cellular components (i. e. whole cell product-WCP, intracellular product-ICP and extracellular product-ECP) of *B. amyloliquefaciens* B894 were used to inhibit the growth of *E. ictaluri* and *A. hydrophila*. Except for ICP, both WCP and ECP showed antagonistic ability against these two bacteria in the environment according to the time length of treatment. WCP effectively inhibited the growth of two pathogens in agar medium with the inhibition zone diameter of 16.3 ± 0.6 mm (for *A. hydrophila*) and 29.7 ± 0.6 mm (for *E. ictaluri*). Both *E. ictaluri* and *A. hydrophila* were not found after 15 hours and 36 hours, respectively, co-culturing in broth medium with *B. amyloliquefaciens* B894, which were added at the same or ten-fold concentrations, compared to the pathogens. Meanwhile, the antagonistic efficacies of the ECP from *B. amyloliquefaciens* B894 against these two pathogens were only observed in broth medium after 24 hours of co-culturing.

Keywords: Cellular component, antagonistic activity, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Edwardsiella ictaluri*, *Aeromonas hydrophila*

Ngày nhận bài: 04/01/2021
Ngày phản biện: 20/01/2021

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Afrin Sadia, Mohammad Nazrul Islam Bhuiyan, 2019. Antagonistic activity of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* against multidrug resistant *Serratia rubidaea*. *BioRxiv the preprint server for biology* [online].
- Das B.K.T., Samal, S.K., Samantaray, B.R., Sethi, S., Pattnaik, P. and Mishra, B.K., 2005. Antagonistic activity of cellular components of *Pseudomonas* species against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 253: 17-24.
- Das B. K. T, Neha Nidhi R.G., Pragyan Roy, A.K.Muduli, P.Swain, S.S.Mishra and P.Jayasankar, 2014. Antagonistic activity of cellular components of *Bacillus subtilis* AN11 against bacterial pathogens. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(5): 795-809.
- Haipeng Cao, Shan He, Ruopeng Wei, Marek Diong, and Lique Lu., 2011. *Bacillus amyloliquefaciens* G1: A potential antagonistic bacterium against Eel-Pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-6.
- Ghosh, S., Ringo, E., Selvam, A.D.G., Rahiman, K.M.M., Sathyan, N., John, N. and Hatha, A.A.M., 2014. Gut associated lactic acid bacteria isolated from the Estuarine fish *Mugil cephalus*: Molecular diversity and antibacterial activities against pathogens. *International journal of aquaculture*, 4: 1-11.
- Sabina Fijan, 2016. Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens, *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health*, Chapter 10: 191-221.
- Shelar SS, Warang SS, Mane SP, Sutar RL, Ghosh JS, 2012. Characterization of bacteriocin produced by *Bacillus atrophaeus* strain JS-2, *International Journal of Biological Chemistry*, 6: 10-16.
- Xi-Yan Gao, Ying Liu, Li-Li Miao, Er-Wei Li, Ting-Ting Hou and Zhi-Pei Liu., 2017. Mechanism of anti-Vibrio activity of marine probiotic strain *Bacillus pumilus* H2, and characterization of the active substance, *AMB Express*, 7: 23.