

## ẢNH HƯỞNG CỦA VI KHUẨN *Lactobacillus fermentum* ĐẾN MỘT SỐ CHỈ TIÊU MIỄN DỊCH VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH CỦA CÁ CHÊM (*Lates calcarifer*)

### EFFECTS OF *Lactobacillus fermentum* DIETARY SUPPLEMENT ON PARAMETERS OF IMMUNE RESPONSE AND BACTERIAL RESISTANCE OF BARRAMUNDI (*Lates calcarifer*)

**Trương Thị Hoa<sup>1</sup>, Nguyễn Ngọc Phước<sup>1</sup>, Đặng Thị Hoàng Oanh<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Khoa Thủy sản - Trường Đại học Nông Lâm Huế

<sup>2</sup> Khoa Thủy sản - Đại học Cần Thơ

Tác giả liên hệ: Trương Thị Hoa (Email: [truongthihoa@huaf.edu.vn](mailto:truongthihoa@huaf.edu.vn))

Ngày nhận bài: 04/07/2019; Ngày phân biên thông qua: 23/12/2019; Ngày duyệt đăng: 25/02/2020

#### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm hiểu ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn *Lactobacillus fermentum* vào thức ăn lên sự đáp ứng miễn dịch tự nhiên của cá chêm (*Lates calcarifer*). Thí nghiệm được bố trí với 4 nghiệm thức và 3 lần lặp. Nghiệm thức đối chứng âm (NT 1): Không bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn và không cảm nhiễm vi khuẩn *Streptococcus iniae* vào xoang bụng cá; Nghiệm thức đối chứng dương (NT 2): Không bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn và cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae* vào xoang bụng cá sau 14 ngày thí nghiệm với liều tiêm là  $1,9 \times 10^5$  CFU/mL/cá; Nghiệm thức 3 (NT 3): Bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn, mật độ  $10^9$  CFU/g thức ăn và không cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*; Nghiệm thức 4 (NT 4): Bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn, mật độ  $10^9$  CFU/g thức ăn và cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae* vào xoang bụng cá sau 14 ngày cho ăn với liều tiêm là  $1,9 \times 10^5$  CFU/mL/cá. Tỷ lệ sống của cá được theo dõi ngay sau khi cảm nhiễm *S. iniae* đến 14 ngày sau cảm nhiễm. Các chỉ tiêu huyết học và khả năng kháng *S. iniae* của huyết thanh cá chêm được đánh giá vào 1, 14, 21 và 28 ngày thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy số lượng tế bào hồng cầu và tổng bạch cầu của cá ở NT 3 và NT 4 ở các ngày 14, 21 và ngày thứ 28 cao hơn so với NT 1 và NT 2 ( $p < 0,05$ ). Ở thời điểm 21 ngày thí nghiệm: số lượng tổng bạch cầu và khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh cá chêm ở NT 4 cao hơn có ý nghĩa thống kê so với NT 2 ( $p < 0,05$ ); hoạt tính lysozyme ở NT 4 cao hơn nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với NT 2 ( $p > 0,05$ ). Ở thời điểm 28 ngày thí nghiệm, tỷ lệ sống của cá ở NT 2 và NT 4 lần lượt là 23,7% và 52,3%.

**Từ khóa:** Cá chêm, đáp ứng miễn dịch, vi khuẩn *Lactobacillus fermentum*.

#### ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate - effects of *Lactobacillus fermentum* supplement in diets on the innate immune response of barramundi (*Lates calcarifer*). The experiment was designed in 4 treatments with triplicates. The negative control (NT 1): no *L. fermentum* supplement to the barramundi diet and no *S. iniae* i.p injection. The positive control (NT 2): no *L. fermentum* supplement to the barramundi diet and *S. iniae* i.p injection to the barramundi cavity after 14 days with the dose of  $1.9 \times 10^5$  CFU/mL/fish. The treatment 3 (NT 3): *L. fermentum* supplement to the barramundi diet at  $10^9$  CFU/g in feed and no *S. iniae* i.p injection. The treatment 4 (NT 4): *L. fermentum* supplement to the barramundi diet at  $10^9$  CFU/g in feed for 14 days before i.p injection to the barramundi with the dose of  $1.9 \times 10^5$  CFU *S. iniae* /mL/fish. Blood samples were collected on day 1, 14, 21 and 28 for hematological analysis and the ability of fish serum collected to identify the against of *S. iniae*. The results showed that the number of red blood cells and total white blood cells of fish in NT 3 and NT 4 on day 14, 21 and 28 were significantly higher than those from NT 1 and NT 2 ( $p < 0.05$ ). Total white blood cells of fish and the antagonistic ability of barramundi serum to *S. iniae* from NT 4 was significantly higher than those from NT 2 ( $p < 0.05$ ) on day 21. The lysozyme activity of fish in NT 4 was not significantly higher than those in NT 2 treatment ( $p > 0.05$ ) on day 21. On day 28, the survival rate of fish in NT 2 and NT 4 treatments were 23.7% and 52.3%, respectively.

**Keywords:** Barramundi, immune response, *Lactobacillus fermentum*.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, thành công của những mô hình nuôi cá chêm đã khẳng định đây là đối tượng nuôi có hiệu quả kinh tế cao. Nghề nuôi cá chêm thương phẩm phát triển mạnh ở một số tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (Lý Văn Khánh và cộng sự, 2016). Riêng tại tỉnh Thừa Thiên Huế, cá chêm được nuôi khá phổ biến và mang lại hiệu quả kinh tế cao (Trần Thị Cẩm Tú và cộng sự, 2017).

Theo Wendover (2010), cá chêm nuôi tại Châu Á thường gặp một số bệnh do vi khuẩn, trong đó bệnh do vi khuẩn *Streptococcus iniae* khá phổ biến. Năm 1999, *S. iniae* gây bệnh trên cá chêm nuôi tại Australia (Bromage và cộng sự, 1999). Năm 2009, vi khuẩn *S. iniae* được phân lập từ cá chêm bị bệnh nuôi tại Khánh Hòa (Tran Vi Hich và cộng sự, 2013) và năm 2016 được phân lập trên cá chêm nuôi tại Thừa Thiên Huế (Trương Thị Hoa và cộng sự, 2018). Bệnh do *S. iniae* có thể gây ra tỷ lệ chết lên đến 70% ở giai đoạn cá chêm giống (Creper và Buller, 2006).

Một trong các biện pháp phòng trị bệnh trên động vật thủy sản đang được chú trọng hiện nay là dùng chế phẩm sinh học. Chế phẩm sinh học có thể tăng cường khả năng miễn dịch của cá chống lại vi khuẩn gây bệnh (Gatesoup, 2008). Trong các nhóm vi sinh vật sử dụng làm chế phẩm sinh học, vi khuẩn *Lactobacillus* đang được nghiên cứu và sử dụng khá phổ biến. Vi khuẩn *Lactobacillus* có thể làm tăng cường phản ứng miễn dịch của vật chủ chống lại tác nhân gây bệnh, có khả năng bám vào tế bào biểu mô ruột, tồn tại và tăng mật độ trong ruột, ngăn chặn hoặc giảm sự bám vào tế bào của các tác nhân gây bệnh, cạnh tranh dinh dưỡng với vi khuẩn gây bệnh, tạo ra acid lactic, hydrogen peroxide và bacteriocin để ức chế sự phát triển của các tác nhân gây bệnh (Lauzon và Ringo, 2011).

Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có các nghiên cứu về ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn đến các chỉ huyết học và khả năng kháng vi khuẩn *S. iniae* trên cá chêm. Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định ảnh hưởng của việc

bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn đến sự biến động số lượng tế bào máu cá chêm, khả năng ức chế *S. iniae* của huyết thanh và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá chêm từ đó có thể nghiên cứu sử dụng chế phẩm sinh học với thành phần chính là *L. fermentum* để phòng bệnh xuất huyết do *S. iniae* gây ra, góp phần phát triển bền vững nghề nuôi cá chêm.

## II. ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Đối tượng và vật liệu nghiên cứu

**Đối tượng:** Một số chỉ tiêu miễn dịch của cá chêm

**Vật liệu:** Cá chêm giai đoạn cá giống, được cung cấp từ trại sản xuất giống Vân Nam, xã Phú Thuận, huyện Phú Vang tỉnh Thừa Thiên Huế; Chủng vi khuẩn *S. iniae* HTA1 và chủng vi khuẩn *L. fermentum* C21 được cung cấp từ phòng thí nghiệm Bệnh thủy sản, khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm Huế.

### 2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Cá chêm thí nghiệm

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 trung bình 8,3 cm/con và khối lượng trung bình 11,4 g/con. Sau khi chuyển về Khoa Thủy sản, trường Đại học Nông Lâm Huế, 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 14 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm. Trong quá trình nuôi, một số yếu tố môi trường được duy trì ở mức thích hợp cho cá phát triển. 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 (theo hướng dẫn của nhà sản xuất).

Thành phần dinh dưỡng của thức ăn Nanolis C: protein thô: 58%; protein tiêu hóa 55%; xơ thô 1%; canxi 2,5 - 3,5%; photpho tổng số 1,5 - 2,5%; lysin tổng số 3,2%; methionin và cystine tổng số 2%. (Ocialis, Việt Nam)

#### 2.2. Chuẩn bị vi khuẩn thí nghiệm

Chủng vi khuẩn *S. iniae* HTA1 được nuôi sinh khối trong môi trường TSB có bổ sung 1,5% NaCl ở nhiệt độ 28°C, sau 24 giờ, tiến

hành ly tâm, đo mật độ quang bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm. Sau đó pha loãng vi khuẩn đến mật độ  $1,9 \times 10^5$  CFU/mL để cảm nhiễm trên cá (đây là liều gây chết 50% ( $LD_{50}$  – Lethal dose 50) trên cá chẻm giống của chủng vi khuẩn *S. iniae* HTA1), (Trương Thị Hoa và cộng sự, 2018)

Chủng vi khuẩn *L. fermentum* C21 được nuôi sinh khối trong ống falcon 50mL có chứa 30mL môi trường MRS ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ, tiến hành ly tâm, đo mật độ quang bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm, sau đó pha loãng vi khuẩn đến mật độ  $10^{10}$  CFU/mL để trộn vào thức ăn cho cá.

Chuẩn bị thức ăn cho cá: vi khuẩn *L. fermentum* mật độ  $10^{10}$  CFU/mL sẽ được hòa đều vào 10 mL nước muối sinh lý trên máy Vortex (IKA, Đức) và xít đều vào 100g thức ăn bằng bình xít vô trùng. Thức ăn sau khi chuẩn bị được cho ăn ngay.

### 2.3. Bố trí thí nghiệm

Bố trí thí nghiệm theo phương pháp của Allameh *et al.* (2013). Thí nghiệm được bố trí với 04 nghiệm thức và 03 lần lặp lại. Nghiệm thức đối chứng âm (nghiệm thức 1 (NT 1)): Không bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn và không cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae* vào xoang bụng cá; Nghiệm thức đối chứng dương (nghiệm thức 2 (NT 2)): Không bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn và cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae* vào xoang bụng cá sau 14 ngày thí nghiệm với liều tiêm là  $1,9 \times 10^5$  CFU/mL/cá; Nghiệm thức 3 (NT 3): Bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn, mật độ  $10^9$  CFU/g thức ăn và không cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*; Nghiệm thức 4 (NT 4): Bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn, mật độ  $10^9$  CFU/g thức ăn và cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae* vào xoang bụng cá sau 14 ngày cho ăn với liều tiêm là  $1,9 \times 10^5$  CFU/mL/cá.

Theo dõi thí nghiệm trong 28 ngày, tiến hành lấy máu ở động mạch đuôi vào ngày thí nghiệm 1; 14; 21 và 28 ở các nghiệm thức (mỗi lần thu mẫu lấy 03 con/bể và không thả lại) để xác định số lượng tế bào máu, khả năng ức chế *S. iniae* của huyết thanh và hoạt tính lysozyme trong huyết thanh.

### 2.4. Phương pháp xác định các chỉ tiêu huyết học

#### 2.4.1. Định lượng hồng cầu

Số lượng hồng cầu trong máu của cá được xác định theo phương pháp của Natt và Herrick (1952). Mật độ hồng cầu được xác định bằng buồng đếm Neubauer và được tính theo công thức:  $HC$  (tế bào/ $mm^3$ ) =  $C \times 10 \times 5 \times 200$

( $C$  là tổng số hồng cầu trong 5 vùng đếm)

#### 2.4.2. Định lượng tổng bạch cầu

Sau khi lấy máu, nhỏ một giọt máu lên lame kính, cho lamel chạm vào giọt máu, đẩy lamel ngược về phía trước. Mẫu máu sau khi khô được cố định bằng cách ngâm trong methanol 2 phút. Để mẫu khô tự nhiên và nhuộm bằng Wright và Giemsa. Số lượng tổng bạch cầu trong máu cá được xác định theo phương pháp của Chinabut và cộng sự. (1991) theo công thức:

$$TBC \text{ (tb/mm}^3\text{)} = \frac{\text{Số bạch cầu trong 1.500 tế bào} \times R}{\text{Số hồng cầu trong 1.500 tế bào}}$$

(TBC: mật độ tổng bạch cầu ( $tb/mm^3$ ); R: mật độ hồng cầu trên buồng đếm hồng cầu ( $tb/mm^3$ ))

### 2.5. Xác định khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh

Khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh cá chẻm được xác định theo phương pháp của Phuong và cộng sự (2007). Chủng vi khuẩn *S. iniae* được nuôi sinh khối trong môi trường TSB có bổ sung 1,5% NaCl, sau 24 giờ, tiến hành ly tâm 6500 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ phần dịch nổi sau ly tâm, bổ sung thêm nước muối sinh lý và tiếp tục ly tâm lần 2, lần 3. Sau đó bổ sung nước muối sinh lý để tạo dung dịch huyền phù, đo mật độ quang bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm, xác định mật độ vi khuẩn cần sử dụng là  $10^6$  CFU/mL. Mẫu máu cá sau khi lấy được cho vào ống eppendorf 1,5mL, tiến hành ly tâm 6500 vòng/phút trong 5 phút, lấy phần huyết thanh. Lấy 75 $\mu$ L dịch huyền phù vi khuẩn *S. iniae* mật độ là  $10^6$  CFU/mL và 25 $\mu$ L huyết thanh cho vào đĩa 96 giếng đáy phẳng. Giếng đối chứng dương (control): cho vào 75 $\mu$ L dịch huyền phù vi khuẩn *S. iniae* mật độ là  $10^6$  CFU/mL và 25 $\mu$ L nước cất vô trùng. Giếng đối chứng âm (blank): cho vào 75 $\mu$ L môi trường TSB

và 25µL nước cất vô trùng. Ủ mẫu qua đêm ở 28°C. Sau đó thêm 100 µL TBTB (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide); (TBTB được pha trong nước cất vô trùng với liều lượng 5mg/mL) vào các giếng và lắc trong 15 giây, đo mật độ quang của các giếng bằng máy đo quang phổ ở bước sóng 600 nm. Số vi khuẩn *S. iniae* bị ức chế ( $S_{uc}$  (%)) bởi huyết thanh của cá chêm được tính theo công thức:

$$S_{uc} (\%) = \frac{OD \text{ mẫu} - OD \text{ blank}}{OD \text{ control} - OD \text{ bank}} \times 100$$

( $S_{uc}$  (%): Tỷ lệ (%) vi khuẩn bị ức chế bởi huyết thanh; OD: Mật độ quang; OD control: Mật độ quang ở giếng đối chứng dương; OD blank: Mật độ quang ở giếng đối chứng âm)

2.6. Xác định hoạt tính lysozyme trong huyết thanh

Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá chêm được xác định theo phương pháp của Kumar và cộng sự (2007). Dựng đường chuẩn lysozyme với các nồng độ 0, 2, 4, 8 và 16 µg/mL. Cho 10 µL dung dịch từ các nồng độ trên cho vào đĩa 96 giếng, tiếp theo cho 200 µL/giếng dịch huyền phù *Micrococcus luteus* (Himedia, Ấn Độ), xác định đường giá trị chuẩn về khả năng phân giải *Micrococcus luteus* của lysozyme. Đối với mẫu huyết thanh của cá, huyết thanh được pha loãng với dung dịch đệm phosphate đến nồng độ cuối cùng là 0,33 mg/mL. Lấy 3 mL dung dịch *Micrococcus luteus* cho vào 50 mL mẫu huyết thanh đã pha loãng trong đệm phosphate, trộn đều mẫu trong 15

giây. Đọc kết quả ở máy đo quang phổ, bước sóng 450 nm sau khi trộn 60 giây. Sự hấp thụ được so sánh với lysozyme tiêu chuẩn của hoạt tính dựa vào đường chuẩn lysozyme về khả năng phân giải *Micrococcus luteus*. Hoạt tính lysozyme được xác định bằng đơn vị/phút/mg protein của huyết thanh. Một đơn vị lysozyme (U) được xác định là lượng lysozyme sẽ làm giảm độ hấp thụ ở bước sóng 450 nm với 0,001 đơn vị hấp phụ/phút/mg (U/phút/mg).

2.7 Xác định tỷ lệ sống của cá

Theo dõi thí nghiệm, ghi nhận dấu hiệu bệnh lý của cá bị bệnh và tiến hành phân lập lại vi khuẩn từ gan, thận, lách và não các mẫu cá bệnh. Xác định tổng số cá sống sau 14 ngày cảm nhiễm *S. iniae*. Tỷ lệ sống của cá được xác định theo công thức (Kumar và cộng sự, 2007):

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{Số cá sống sau khi cảm nhiễm } S. iniae}{\text{Số cá cảm nhiễm } S. iniae} \times 100$$

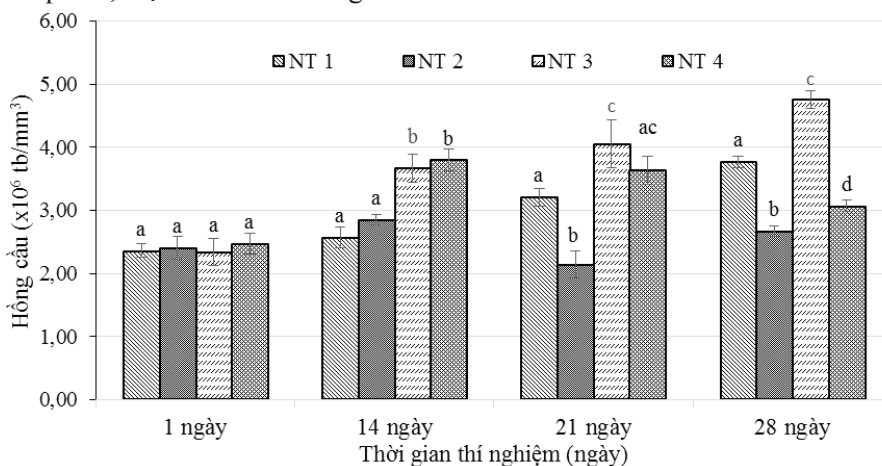
3. Xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được nhập và xử lý sơ bộ trên phần mềm Microsoft Excel 2016, sau đó phân tích phương sai (ANOVA) hai nhân tố theo mô hình tuyến tính tổng quát (General Linear Model) trên phần mềm SPSS version 20.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả xác định các chỉ tiêu huyết học của cá chêm

1.1. Số lượng hồng cầu trong máu cá chêm



Ghi chú: Gạch đứng trên đầu các cột trong hình là độ lệch chuẩn; Các cột trong cùng ngày có các chữ cái a, b, c, d khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

Hình 1. Biến động số lượng hồng cầu trong máu cá chêm.

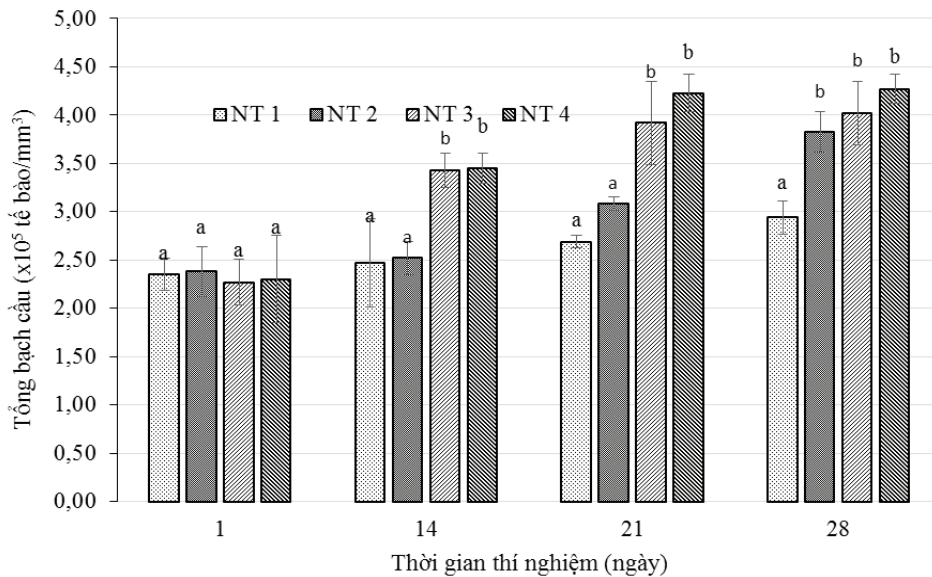
Theo dõi biến động số lượng hồng cầu trong máu cá chêm thí nghiệm vào các ngày 1; 14; 21 và ngày thứ 28 của thí nghiệm cho thấy, ở ngày đầu thí nghiệm số lượng hồng cầu dao động từ  $2,34 \times 10^6 - 2,47 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup> và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở các nghiệm thức thí nghiệm ( $p > 0,05$ ). Ở ngày thứ 14, số lượng hồng cầu ở NT 1 và NT 2 lần lượt là  $2,57 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup> và  $2,85 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup> thấp hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với NT 3 ( $3,67 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup>) và NT 4 ( $3,8 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup>). Ở thời điểm 21 ngày, số lượng hồng cầu ở NT 3 cao nhất ( $4,05 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup>), cao có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác ( $p < 0,05$ ). Đến ngày thứ 28, số lượng hồng cầu ở NT 3 là  $4,76 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup> và cao hơn so với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ); trong khi đó NT 2 và NT 4, số lượng hồng cầu lần lượt là  $2,67 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup> và  $3,24 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup>, thấp hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với NT 1 và NT 3. Như vậy có thể thấy rằng ở NT 3 (bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn và không cảm nhiễm *S. iniae*), số lượng hồng cầu vào ngày thứ 21 và 28 cao hơn so với các nghiệm thức khác. Kết quả nghiên cứu này cũng cho thấy ở ngày thứ 14 (trước khi gây cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*), số lượng hồng cầu ở NT 3 và NT 4 (có bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn) cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với NT 1 và NT 2 (không bổ sung *L. fermentum* 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. fermentum* 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. fermentum* vào thức ăn). (Hình 1)

Như vậy có thể thấy rằng việc bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn đã làm tăng số lượng hồng cầu trong máu cá, giúp bảo vệ cơ thể hạn chế tác hại của mầm bệnh. Tương tự với nghiên cứu của Irianto và Austin (2002) cho rằng việc bổ sung vi khuẩn lactic vào thức ăn với liều  $10^7$  CFU/g thức ăn có thể làm gia tăng đáng kể số lượng hồng cầu của cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) trong 14 ngày cho ăn. Theo Sampath và cộng sự (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 và cộng sự, 2008). Theo Anderson và cộng sự (1996), số lượng hồng cầu trên cá chêm dao động từ  $3,25 \times 10^6 - 5,2 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup>. Trên cá trôi Ấn Độ, số lượng hồng cầu dao động từ  $1,77 \times 10^6 - 2,35 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup>, sau khi cảm nhiễm *Aeromonas hydrophila*, số lượng hồng cầu của cá giảm ( $1,61 \times 10^6 - 1,8 \times 10^6$  tb/mm<sup>3</sup>) trong 20 ngày thí nghiệm (Kumar và cộng sự, 2007).

### 1.2. Số lượng tổng bạch cầu trong máu cá chêm

Kết quả xác định số lượng tổng bạch cầu trong máu cá chêm cho thấy ngày đầu của thí nghiệm, số lượng tổng bạch cầu ở các nghiệm thức dao động từ  $2,27 \times 10^5 - 2,38 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup> và không có sự khác biệt thống kê giữa các nghiệm thức thí nghiệm ( $p > 0,05$ ). Đến ngày thứ 14 (trước khi gây cảm nhiễm vi khuẩn *S. iniae*), số lượng tổng bạch cầu ở NT 1 và NT 2 lần lượt là  $2,47 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup> và  $2,52 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup>, thấp hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với tổng bạch cầu ở NT 3 ( $3,43 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup>) và NT 4 ( $3,45 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup>). Kết quả này cho thấy ở ngày thứ 14, số lượng tổng bạch cầu ở 2 nghiệm thức có bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn (NT3 và NT4) đã khác biệt có ý nghĩa thống kê so với 2 nghiệm thức còn lại (NT1 và NT2 không bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn). Đến ngày thứ 21, số lượng tổng bạch cầu ở NT 1 là  $2,69 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup>, thấp hơn nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với NT 2; số lượng tổng bạch cầu ở NT 3 và NT 4 cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với NT 1 và NT 2. Đến ngày thứ 28, số lượng tổng bạch cầu ở NT 1 là  $2,94 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup>, thấp hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức khác. Điều này cho thấy đến ngày thứ 28, số lượng tổng bạch cầu ở NT 2 mới tăng lên và khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với NT 3 và NT 4. Như vậy có thể thấy rằng



Ghi chú: Gạch đứng trên đầu các cột trong hình là độ lệch chuẩn; Các cột trong cùng ngày có các chữ cái a, b, c, d khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

**Hình 2. Biến động số lượng tổng bạch cầu trong máu cá chêm.**

việc bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn đã kích hoạt số lượng bạch cầu tăng lên từ rất sớm (ngày thứ 14), giúp bảo vệ cơ thể chống lại sự xâm nhiễm của vi khuẩn *S. iniae*. (Hình 2)

Theo Anderson và cộng sự (1996), số lượng tổng bạch cầu trong máu cá chêm dao động từ  $0,65 \times 10^5 - 5,6 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup> và trung bình là  $4,48 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup>. Bạch cầu là những tế bào máu có nhân, kích thước khác nhau tùy thuộc vào từng loại bạch cầu và 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 và cộng sự, 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. 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. Tương tự với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thu Dung (2016), số lượng tổng bạch cầu trong máu cá kèo bị bệnh xuất huyết do *Streptococcus dysgalactiae* cao hơn có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với cá không bị bệnh. Theo Kumar và cộng sự (2007), số lượng tổng bạch cầu trong máu cá trôi Ấn Độ dao động từ  $1,17 \times 10^5 - 1,61 \times 10^5$  tb/mm<sup>3</sup>, tổng

bạch cầu tăng cao nhất ở thí nghiệm bổ sung gelatin vào thức ăn và cảm nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila*.

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

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 28 ngày thí nghiệm. Khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh cá chêm không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê (p>0,05) ở các nghiệm thức vào ngày 1 và ngày thứ 14 của thí nghiệm. Đến ngày thứ 21, khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh ở NT 4 (có bổ sung *L. fermentum* và cảm nhiễm *S. iniae*) cao hơn có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các nghiệm thức khác. Ở NT 3 (bổ sung *L. fermentum* và không cảm nhiễm *S. iniae*) khả năng ức chế *S. iniae* của huyết thanh cao có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với các NT 1 và NT 2. Đến ngày thứ 28, khả năng ức chế *S. iniae* của huyết thanh ở NT 4 cao hơn so với NT 2 (p<0,05). (Bảng 1)

Kết quả này cho thấy khi bổ sung *L. fermentum* 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

**Bảng 1: Khả năng ức chế vi khuẩn *S. iniae* của huyết thanh cá chêm**

Nghiệm thức thí nghiệm	Ức chế vi khuẩn <i>S. iniae</i> của huyết thanh (%); (TB±SD)			
	1 ngày	14 ngày	21 ngày	28 ngày
NT 1	21,3±3,2 <sup>a</sup>	26,7±1,5 <sup>a</sup>	31,0±4,6 <sup>a</sup>	35,0±5,0 <sup>a</sup>
NT 2	24,7±5,0 <sup>a</sup>	30,0±5,6 <sup>a</sup>	43,0±3,0 <sup>b</sup>	46,3±3,5 <sup>b</sup>
NT 3	26,0±4,0 <sup>a</sup>	32,3±8,0 <sup>a</sup>	55,0±5,0 <sup>c</sup>	60,7±1,2 <sup>c</sup>
NT 4	24,7±2,9 <sup>a</sup>	34,3±4,7 <sup>a</sup>	74,0±2,6 <sup>d</sup>	64,3±2,1 <sup>c</sup>

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

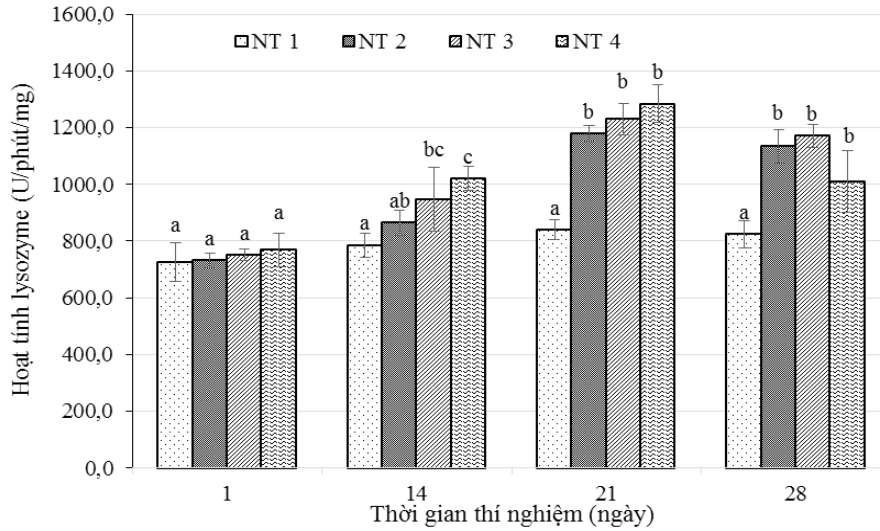
khác. Do đó, tỷ lệ sống của cá chêm ở NT 4 cao hơn so với NT 2. Tương tự với nghiên cứu của Allameh và cộng sự (2013), vi khuẩn *L. fermentum* phân lập từ dạ dày cá lóc có khả năng tăng sức đề kháng của cá khi bổ sung vào thức ăn, vi khuẩn *L. fermentum* điều chỉnh hệ vi sinh vật đường ruột, làm tăng cường các thông số miễn dịch và huyết học kháng lại vi khuẩn gây bệnh trên cá. Trên cá chêm (*Dicentrarchus labrax*), sử dụng *Lactobacillus delbrueckii* làm giàu rotifer để làm thức ăn cho cá chêm có tác dụng gia tăng hoạt động hệ miễn dịch của cá (Carnevali và cộng sự, 2006). Theo Irianto và Austin (2002), khi bổ sung vi khuẩn *Carnobacterium* sp. vào thức ăn cho cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) với liều lượng  $10^6$  -  $10^8$  CFU/g thức ăn, làm tăng tỷ lệ sống, tăng tốc độ tăng trưởng và tăng hoạt động hệ miễn dịch của cá.

### 3. Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh

Kết quả xác định hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá chêm vào ngày đầu tiên của thí nghiệm ở các nghiệm thức dao động từ 725,3 – 768,2 U/phút/mg và không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức thí nghiệm ( $p > 0,05$ ). Đến ngày thứ 14, hoạt tính lysozyme ở NT 4 là 1021,4 U/phút/mg, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với NT 1 (785,9 U/phút/mg); hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá chêm ở NT 3 và NT 4 (có bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn) cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với NT 1 và NT 2 (không bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn). Đến ngày thứ 21, hoạt tính lysozyme ở NT 1 là 840,2 U/phút/mg, thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác ( $p < 0,05$ ); ở NT 4 (có bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn và cảm nhiễm *S. iniae*) hoạt tính lysozyme của huyết thanh cao hơn nhưng

không khác biệt có ý nghĩa thống kê so với NT 2 (không bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn và cảm nhiễm *S. iniae*), ( $p > 0,05$ ). Đến ngày thứ 28, hoạt tính lysozyme ở NT 2 và NT 4 lần lượt là 1133,9 U/phút/mg và 1010,5 U/phút/mg; hoạt tính lysozyme của huyết thanh cá chêm ở NT 4 (có bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn và cảm nhiễm *S. iniae*) thấp hơn nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với NT 2 (không bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn và cảm nhiễm *S. iniae*) và NT 3 (chỉ bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn). (Hình 3)

Tương tự với nghiên cứu của Kumar và cộng sự (2007), hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá trôi Ấn Độ (*Labeo rohita*) dao động từ 675,41 – 903,60 U/phút/mg. Sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* vào xoang bụng với liều tiêm là  $1,8 \times 10^8$  CFU/mL, hoạt tính lysozyme trong huyết thanh của cá tăng và dao động trong khoảng 826,71 - 1123,34 U/phút/mg. Theo Trinh Dinh Khuyen và cộng sự (2017), khi bổ sung lactoferrin vào thức ăn với các khẩu phần ăn khác nhau và cảm nhiễm vi khuẩn *Aeromonas salmonicida*, hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá hồi (*Oncorhynchus mykiss*) dao động trong khoảng 1100 – 1700 U/phút/mg và không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở các nghiệm thức thí nghiệm nhưng tỷ lệ sống của cá ở các nghiệm thức thí nghiệm cao hơn so với nghiệm thức đối chứng. Tương tự với nghiên cứu này và kết quả các nghiên cứu của Kumar và cộng sự (2007) và Trinh Dinh Khuyen và cộng sự (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.



Ghi chú: Gạch đứng trên đầu các cột trong hình là độ lệch chuẩn; Các cột trong cùng ngày có các chữ cái a, b, c, d khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ).

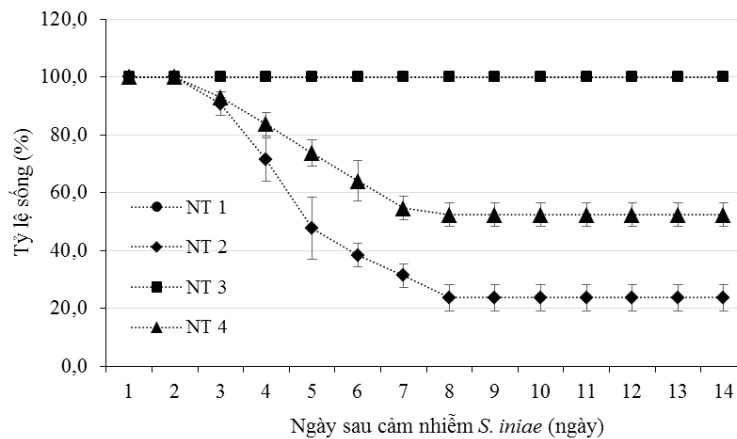
**Hình 3. Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá chêm.**

**4. Tỷ lệ sống của cá**

Kết quả theo dõi tỷ lệ sống của cá cho thấy ở NT 2 và NT 4, sau khi cảm nhiễm *S. iniae* đến 28 ngày thí nghiệm, tỷ lệ sống của cá chêm lần lượt là 23,7% và 52,3%. Điều này cho thấy ở NT 4, cá được cho ăn thức ăn bổ sung *L. fermentum* và cảm nhiễm *S. iniae* có tỷ lệ sống cao hơn có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với NT 2 (không bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn và cảm nhiễm *S. iniae*). Trong khi đó ở NT 1 và

NT 3 không cảm nhiễm *S. iniae*, tỷ lệ sống của cá là 100% (Hình 4).

Tương tự với nghiên cứu của Allameh và cộng sự (2013), khi bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn cho cá lóc (*Channa striatus*) với liều lượng  $10^7$  CFU/g thức ăn và cảm nhiễm *A. hydrophila*, tỷ lệ sống của cá là 56,6%, trong khi đó ở nghiệm thức đối chứng (không bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn và cảm nhiễm *A. hydrophila*) tỷ lệ sống của cá là 0%.



Ghi chú: Gạch đứng trên đầu các cột trong hình là độ lệch chuẩn.

**Hình 4. Tỷ lệ sống của cá sau khi cảm nhiễm *S. iniae*.**

**IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ**

**1. Kết luận**

Cá chêm cho ăn thức ăn có bổ sung *L. fermentum* có số lượng hồng cầu và tổng bạch

cầu tăng so với nghiệm thức không bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn. Tỷ lệ sống và khả năng ức chế *S. iniae* của huyết thanh cá chêm ở nghiệm thức có bổ sung *L. fermentum* vào thức



ăn và cảm nhiễm *S. iniae* cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức không bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn và cảm nhiễm *S. iniae*. Hoạt tính lysozyme trong huyết thanh cá chêm ở nghiệm thức không bổ sung *L. fermentum* vào thức ăn và không cảm nhiễm *S. iniae* thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức khác.

## 2. Kiến nghị

Tiếp tục nghiên cứu ảnh hưởng của việc bổ sung vi khuẩn *L. fermentum* vào thức ăn đến khả năng kháng bệnh do vi khuẩn *S. iniae* trên cá chêm trong điều kiện thực tế tại vùng nuôi.

## LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Trường Đại học Nông Lâm Huế và dự án VLIR Network Việt Nam đã tài trợ cho nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tiếng Việt

1. Nguyễn Thu Dung, 2016. Xác định tác nhân vi khuẩn gây bệnh xuất huyết trên cá bông kèo (*Pseudapocryptes elongatus*). Luận án Tiến sĩ. Trường Đại học Cần Thơ. Cần Thơ
2. Lý Văn Khánh, Lê Việt Hà và Trần Ngọc Hải, 2016. Đánh giá tiềm năng phát triển mô hình nuôi cá chêm (*Latescalcarifer*) trong ao ở các tỉnh ven biển đồng bằng sông cửu long. *Tạp chí khoa học trường Đại học An Giang*, số 11(3): 60 – 71.
3. Trương Thị Hoa, Nguyễn Ngọc Phước và 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.
4. Trần Thị Cẩm Tú, Nguyễn Thị Minh Hương và Nguyễn Hà Quỳnh Giao, 2017. Hiện trạng phát triển nuôi trồng thủy sản nước lợ ở xã Hải Dương, Hương Phong, Thị xã Hương Trà, tỉnh Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học và Giáo dục Trường Đại học Sư phạm Huế*, số 3(43): 112-121.

### Tiếng Anh

5. Aderson, I.G., L.F. Schaumuller and H.L. Kramer, 1996. A preliminary study on the hematology of freshwater-seared sea bass/barramundi, *Lates calcarifer*. *Asian Fisheries Science*, 9:101-107.
6. Allameh, S.K., M.F. Yusoff , H.M. Daud, E. Ringo, A. Ideris and C.R. Saad, 2013. Characterization of a Probiotic *Lactobacillus fermentum* Isolated from Snakehead, *Channa striatus*, Stomach. *World Aquaculture Society*, 44(6): 835-844.
7. Bromage, E.S., Thomas, A. and Owens, L., 1999. *Streptococcus iniae*, a bacterial infection in barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquaculture Organisms*, 36(3):177–181.
8. Carnevali, O., L. Vivo, R. Sulpizio, I. Olivotto, S. Silvi and A. Cresci, 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258(1-4): 430-438.
9. Chinabut, S., C. Limsuwan and P. Kitsawat, 1991. Histology of The Walking Catfish *Clarias Batrachus*. *Aquatic Animal Health Research Institute*, 96pp.
10. Creeper, J.H. and N.B. Buller, 2006. An outbreak of *Streptococcus iniae* in barramundi (*Lates calcarifer*) in freshwater cage culture. *Australian Veterinary Journal*, 84(11): 408–411.
11. Gatesoupe, F.J, 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1-3): 107-114.

12. Irianto, A. and B. Austin, 2002. Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 25(6): 333-342.
13. Kumar, V., N.P. Sahu, A.K. Pal and S. Kumar, 2007. Immunomodulation of *Labeo rohita* juveniles due to dietary gelatinized and non-gelatinized starch. *Fish and Shellfish Immunology*, 23(2):341-53.
14. Lauzon, H.L. and E. Ringo, 2011. Prevalence and application of lactic acid bacteria in aquatic environments. In: *Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects*, Fourth Edition. New York, USA, 601-639.
15. Martins, H.R., L.M. Figueiredo, J.C.O. Valamiel-Silva, C.M. Carneiro, G.L.L. Machado-Coelho, D.M. Vitelli-Avelar, M.T. Bahia, O.A. Martins-Filho, A.M. Macedo and M. Lana, 2008. Persistence of PCR-positive tissue in benzimidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6): 1319–1327.
16. Natt, M. P. and C.A. Herrick, 1952. A new blood diluent for counting erythrocytes and leukocytes of the chicken. *Poultry Science*, 31(4):735-738.
17. Phuong N. D., M. Effendy, A. Wahid and A. Munafi, 2007. Non-specific immune responses towards ascorbic acid supplementation in hybrid catfish (*Clarias gariepinus* x *C. Macrocephalus*) feed. Master thesis: Universiti Malaysia Terengganu, Malaysia.
18. Sampath, K., R. James and K.M.A. Akbar, 1998. Effects of copper and zinc on blood parameters and prediction of their recovery in *Oreochromis mossambicus*. *Indian Journal of Fisheries*, 45:129–139.
19. Tran Vi Hich, Vu Dang Ha Quyen, Nguyen Huu Dung and H.I. Wergeland, 2013. Experimental *Streptococcus iniae* infection in barramundi (*Lates calcarifer*) cultured in Vietnam. *International Journal of Aquatic Science*, 4(1): 3-12.
20. Trinh D.K., Syaghalirwa N.M., Valérie C., Jessica D., Stéphane B., Peter B., Felipe E.R., Lluís T., Patrick K., 2017. Physiological and immune response of juvenile rainbow trout to dietary bovine lactoferrin. *Fish and Shellfish Immunology*, 71(2017): 359-371.
21. Wendover, N., 2010. Important disease of farmed barramundi in asia. *Aquaculture Asia Pacific*, 6: 26-29.
22. Zinkl, J.G., W.T. Cox and C.S. Kono, 1991. Morphology and cytochemistry of leucocytes and thrombocytes of six specie of fish. *Comparative Haematology International*, 1:187-195.