# Evaluation of antimicrobial potential of extracts from *Eclipta alba* against bacteria causing snakehead (*Channa striata*) bacillary necrosis disease at An Giang province

Nguyen Thi Thuy Hang, Trinh Thi Lan,
Nguyen Huu Yen Nhi, Nguyen Thi Bich Hanh

**Abstract**

Bacteria causing internal white spot disease in snakehead fish fingerling (*Channa striata*) in An Giang province have typical clinical signs as whitish nodules in the liver, spleen and kidney. On tryptic soya agar, the bacteria have small pale yellow colonies, after incubating at 28°C for 24-36 hours, negative Gram and short rod-shaped, motile, catalase and oxidase positive. Based on morphological, physiological, biochemical and genetic sequencing results, *Aeromonas schubertii* species were identified. The result of the antibacterial activity of extracts from *Eclipta alba* for *Aeromonas schubertii* with 0.5%; 1.0% and 1.5% dosage showed that all concentrations had antagonism compared with the control. The average diameter of inhibition ring was largest at a concentration of 1.5%; followed by 1.0% and 0.5%, respectively, such as 15.0 ± 0.00 mm; 14,0 ± 0.00 mm and 12.7 ± 0.58 mm. At the concentration of 1.5%, the survival rate of snakehead fish was 83.3% ± 3.33 and the RPS value was 54.5% ± 15.75.

**Keywords:** *Channa striata, Aeromonas schubertii, Eclipta alba,* internal white spot disease, antimicrobial activity

Ngày nhận bài: 16/02/2023
Ngày phản biện: 10/3/2023
Người phản biện: TS. Đặng Thụy Mai Thy
Ngày duyệt đăng: 28/3/2023

# SỰ HIỆN DIỆN CỦA LOÀI *Aeromonas* spp. Ở CÁ TRA BỆNH XUẤT HUYẾT VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ CÁC KIỂU HÌNH LIÊN QUAN ĐẾN ĐỘC LỰC CỦA CHỦNG *Aeromonas hydrophila*

Lê Thị Thu Thảo[1], Vũ Thị Thanh Hương[1], Bùi Nguyễn Chí Hiếu[1],
Hồ Phú Khánh[2], Phan Đỗ Trọng Nghĩa[3], Ngô Huỳnh Phương Thảo[1,*]

## TÓM TẮT

*Aeromonas* spp. là các tác nhân gây bệnh chính trong thủy sản, tuy nhiên việc định danh loài *Aeromonas* spp. bằng phương pháp PCR hiện chưa có độ chính xác cao. Bằng phương pháp giải trình tự gen *gyrB*, 40% chủng *Aeromonas* spp. trong tổng số 77 chủng được phân lập từ cá tra bị xuất huyết là chủng *A. hydrophila* và 49% số chủng khảo sát là *A. dhakensis.* Điều này cho thấy, dịch xuất huyết ở ao nuôi cá tra không chỉ bởi tác nhân chính *A. hydrophila* gây ra mà còn có sự hiện diện của *A.dhakensis.* Trong 332 chủng *Aeromonas* spp. khảo sát, 83 chủng *A. hydrophila* độc lực cao (vAh) và 03 chủng *A. hydrophila* không có độc lực (non-vAh) được phát hiện. Khi so sánh một số yếu tố kiểu hình liên quan đến độc lực của hai nhóm này, nhóm vAh có hoạt tính exoprotease cao hơn so với nhóm non-vAh, trong khi đó khả năng bơi sau 48 h ủ của nhóm non-vAh mạnh hơn so với nhóm vAh. Khả năng tạo màng sinh học biofilm và khả năng dịch chuyển bề mặt của hai nhóm chủng không có sự khác nhau.

**Từ khóa:** Cá tra, bệnh xuất huyết, *Aeromonas* spp., *gyrB*, biofilm, exoprotease

[1] Phòng Công nghệ sinh học Thủy sản, Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh
[2] Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh
[3] Đại học Quốc tế, Đai học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh
* Tác giả liên hệ, email: nhpthao.snn@tphcm.gov.vn

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Hiệp hội Chế biến và xuất khẩu Thủy sản Việt Nam (Vasep), cá tra ngày càng được người tiêu dùng trên thị trường thế giới yêu thích. Tính đến hết quý I năm 2023, xuất khẩu cá tra cả nước đạt gần 447 triệu USD, giảm 32% so với cùng kì năm 2022. Trong 6 năm, từ 2017 - 2022, mặc dù diện tích nuôi cá tra có xu hướng giảm nhưng sản lượng cá tăng dần từ 1,2 triệu tấn năm 2017 lên 1,7 triệu tấn năm 2022, cho thấy năng suất nuôi cá tra ngày càng được cải thiện. Tuy nhiên, ngoài việc phải đối mặt với sự cạnh tranh của các nhà xuất khẩu đến từ các nước trên thế giới, thì tình hình dịch bệnh trong nước cũng đang diễn biến phức tạp khiến ngành nuôi cá tra luôn phải đối mặt với nhiều khó khăn, thách thức. Chi *Aeromonas* phân bố phổ biến trong môi trường nước, là tác nhân gây bệnh trên nhiều vật chủ khác nhau như cá, động vật lưỡng cư, chim, động vật bò sát và động vật có vú (Pang *et al.*, 2015). Hiện nay, *A. hydrophila* được xem là tác nhân gây bệnh xuất huyết chính trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) nuôi tại Việt Nam (Ngo *et al.*, 2022; Panangala *et al.*, 2007). Tuy nhiên, mức độ định danh chính xác của phương pháp PCR đối với chi *Aeromonas* chưa cao do sự tương đồng quá cao giữa các loài. Do đó, giải trình tự gen house-keeping vẫn là kỹ thuật phân loài có độ chính xác cao nhất (Stackebrandt *et al.*, 2002). Trong đó, *gyrB* (mã hóa tiểu đơn vị B của DNA gyrase, một topoisomerase DNA loại II) đã được báo cáo rằng có thể là dấu hiệu phát sinh gen thích hợp cho hệ thống phân loại vi khuẩn (Watanabe *et al.*, 2001).

Sự hiện diện của chủng *A. hydrophila* độc lực cao và chủng không độc lực trong ao nuôi cá tra đã được công bố vào năm 2022 (Ngo *et al.*, 2022). Tuy nhiên, sự hiểu biết về các yếu tố hình thành nên độc lực của chủng *A. hydrophila* độc lực cao (vAh) vẫn còn hạn chế. Trong đó, màng sinh học có liên quan đến khả năng gây bệnh của vi khuẩn và là nguyên nhân chính gây nhiễm trùng và kháng thuốc (Parsek và Singh, 2003; Sakimura *et al.*, 2015). Khả năng di động bằng hệ thống roi cực (swimming motality) và roi bên (swarming motality) của vi khuẩn đều đóng vai trò quan trọng trong sinh bệnh học (Lowry *et al.*, 2014). Bên cạnh đó, hoạt động exoprotease của *A. hydrophila* tiết ra metallicoprotease, kẽm protease và serine protease, đóng vai trò quan trọng trong việc xâm lấn và gây nhiễm khuẩn (Talagrand-Reboul *et al.*, 2017).

Chính vì vậy, trong nghiên cứu hiện tại, các chủng *Aeromonas* spp. phân lập từ ao nuôi cá tra nhiễm bệnh xuất huyết được định danh bằng phương pháp giải trình tự gen *gyrB* nhằm khảo sát loài *Aeromonas* spp. nào liên quan đến bệnh xuất huyết trên cá tra. Đối với tác nhân gây bệnh phổ biến *A. hydrophila* trên cá tra, khả năng tạo màng sinh học, di động và sản sinh exoprotease giữa chủng *A. hydrophila* độc lực cao và chủng không độc lực được so sánh để tìm hiểu xem yếu tố nào có liên quan đến độc lực của *A. hydrophila*.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Bên cạnh việc phân lập bổ sung 70 chủng *Aeromonas* spp. từ các ao nuôi cá tra tại khu vực Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL), chúng tôi sử dụng bộ sưu tập *Aeromonas* spp. của Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh (HCMBiotech) đã được phân lập từ năm 2013 đến năm 2019 (n = 262).

Các môi trường vi sinh dùng để phân lập *Aeromonas* spp. gồm có Rimler-Shotts (RS, Himedia), Tryptone Soya Agar (TSA, Himedia), Luria Bertani (LB, Himedia, Ấn Độ), M9 (7 g/L $Na_2HPO_4$, 30 g/L $KH_2PO_4$, 5 g/L NaCl, 10 g/L $NH_4Cl$, 15 g/L agarose, 30 mL myo-inositol 10% và 2 mL dung dịch $MgSO_4$ 1M). Các hóa chất dùng để PCR và giải trình tự gồm có: DreamTaq Green PCR master mix (Thermo Scientific), BigDyeTM Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Mỹ).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### *2.2.1. Thu thập và định danh các chủng Aeromonas spp. từ các mẫu cá tra nhiễm bệnh*

Các mẫu cá tra (giai đoạn cá giống, cá giống nuôi lên cá thịt) có các dấu hiện bệnh lý như xuất huyết, lở loét thân,… được thu thập tại Đồng Tháp, Vĩnh Long, Long An, Cần Thơ, Tiền Giang và An Giang, bảo quản trong đá và vận chuyển về HCMBiotech. Bề mặt cá được lau bằng cồn 95°, sau đó mang, gan, lách và thận được ria trên môi trường RS, ủ 28°C qua đêm. Một số khuẩn lạc có hình thái nghi ngờ là *Aeromonas* (tròn, lồi, màu kem) được cấy chuyển sang đĩa TSA và tách DNA để định danh bằng phương pháp PCR với gen aerolysin (Panangala

*et al.*, 2007). Kết quả điện di được quan sát bằng máy chụp ảnh gel điện di (GelDoc-it2, UVP).

Kết hợp với bộ sưu tập *Aeromonas* spp. của HCMBiotech đã được phân lập từ năm 2013 đến nay (n = 262), một số chủng *Aeromonas* spp. đại diện được chọn để định danh loài bằng cách giải trình tự gen *gyrB* (Soler *et al.,* 2004). Cây phân loài dựa trên gen *gyrB* được vẽ bằng phần mềm MEGAX (Tamura *et al.*, 2013) theo phương pháp Maximum Likelihood, mô hình Tamura-Nei, Gamma-Distributed 5, bootstrap 1.000. Đoạn gen *gyrB* của các chủng *A. hydrophila* ATCC 7966 và ATCC 49140, *A. bestiarum* ATCC 23211, *A. trota* ATCC 49657, *A. caviae* ATCC 49657, *A. veronii* ATCC 35624, *A. salmonicida* ATCC 33658, *A. schubertii* ATCC 43700T, *A. dhakensis* 9KS6 và SA1, *A. jandaei* ATCC 49568T được thu nhập từ ngân hàng gen làm trình tự tham chiếu.

### *2.2.2. Nhận diện chủng Aeromonas hydrophila độc lực cao*

Chủng *A. hydrophila* độc lực cao (hypervirulent *A. hydrophila*, vAh) có thể được phân biệt với các chủng *Aeromonas* sp. khác bằng cách khuếch đại đoạn 167 bp của vùng đọc mở đặc trưng của chủng vAh và khả năng tạo khuẩn lạc trên môi trường cơ bản tối thiểu M9 (Griffin *et al.*, 2013; Tekedar *et al.*, 2013).

### *2.2.3. Khảo sát các yếu tố hình thành độc lực của vi khuẩn A. hydrophila*

Một số chủng vAh và chủng non-vAh đại diện được chọn để so sánh kiểu hình có liên quan đến độc lực của vi khuẩn. Bên cạnh đó, chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC 7966 cũng được sử dụng trong các thí nghiệm.

*a) Khả năng tạo màng sinh học (biofilm)*

Dịch nuôi cấy sau 16 giờ của vi khuẩn *A. hydrophila* trong môi trường LB được hiệu chỉnh về OD 1 ở bước sóng 600 nm ($OD_{600nm}$). Sau đó, chuyển 200 µL dịch khuẩn vào 2 mL môi trường LB, ủ môi trường ở 28°. Sau 48 giờ, dịch khuẩn được pha loãng 50 lần bằng môi trường LB, chia đều vào các giếng trên đĩa 96 giếng (100 µL/giếng), ủ đĩa ở 28°C, 72 giờ. Mức độ của các tế bào vi khuẩn được đánh giá ở bước sóng 600 nm bằng máy đọc đĩa 96 giếng (VersaMax™ Microplate Reader, Mỹ). Sau đó, lớp tế bào được rửa bằng đệm PBS 1X (200 µL/giếng), để khô qua đêm trước khi được nhuộm 125 µL/giếng bằng dung dịch Crystal Violet (Himedia, Ấn Độ) trong vòng 30 phút. Các giếng được rửa lại bằng PBS 1X và để khô qua đêm. Crystal Violet được hòa tan trở lại bằng dung dịch ethanol 95% trong 10 phút, đo giá trị mật độ quang ở bước sóng 595 nm. Sự hình thành màng sinh học (biofilm formation index, BFI) được xác định theo công thức sau: BFI = (AB-CW)/(GB-GW). *Trong đó: AB là giá trị mật độ quang ở bước sóng 595 nm ($OD_{595nm}$) của vi khuẩn sau khi nhuộm crystal violet, CW là giá trị mật độ quang ở bước sóng 595 nm ($OD_{595nm}$) của đối chứng, GB là giá trị mật độ quang của vi khuẩn ở bước sóng 600nm ($D_{600nm}$), GW là giá trị mật độ quang của vi khuẩn ở bước sóng 600 nm ($OD_{600nm}$) đối chứng (chỉ chứa môi trường LB).* Mức độ hình thành màng sinh học được phân thành ba loại: yếu (0,1 < BFI ≤ 0,5), trung bình (0,5 < BFI ≤ 1), hoặc mạnh (BFI > 1) (Jahid *et al.*, 2013).

*b) Khả năng di động*

Khả năng di động của *A. hydrophila* được đánh giá dựa trên khả năng bơi (swimming motility) và khả năng dịch chuyển bề mặt (swarming motility). Đối với khả năng bơi, 1,5 µL dịch nuôi cấy sau 16 giờ ở $OD_{600nm}$ 1 của chủng *A. hydrophila* được nhỏ vào giữa đĩa thạch LB với 0,3% bacto-agar (Biobasic, Cannada), ủ đĩa ở 25°C và ghi nhận đường kính vòng vi khuẩn (mm) sau 24 và 48 giờ ủ. Trong khi đó, đối với khả năng dịch chuyển bề mặt, đĩa thạch LB bổ sung 0,5% bacto-agar (Biobasic, Cannada) được sử dụng và ghi nhận đường kính vòng vi khuẩn (mm) sau bảy ngày ủ ở 25°C (Jahid *et al.*, 2013).

*c) Hoạt tính exoproteases*

Hoạt tính exoprotease được đánh giá bằng bộ kit The Thermo Scientific™ Pierce™ Fluorescent Protease Assay theo protocol của Jahid *et al.* (2013). Dịch nuôi cấy sau 16 giờ của chủng *A. hydrophila* trong môi trường LB được pha loãng 5 lần, xác định mật độ vi khuẩn bằng phương pháp nhỏ giọt (Miles/Misra) và ly tâm 20.000 xg, 20 phút, 4°C. Dịch nổi sau ly tâm được dùng để xác định hoạt tính exoprotease theo hướng dẫn của bộ kit bằng đĩa 384 giếng Greiner trắng (Sigma-Aldrich, Mỹ) với 10 lần lặp lại. Đường chuẩn được xây dựng với bảy nồng độ trypsin khác nhau. Độ phát huỳnh quang của các mẫu được hiệu chỉnh về cùng mật độ phát triển của vi khuẩn (CFU/mL) để so sánh hoạt tính exoproteases giữa các mẫu vi khuẩn.

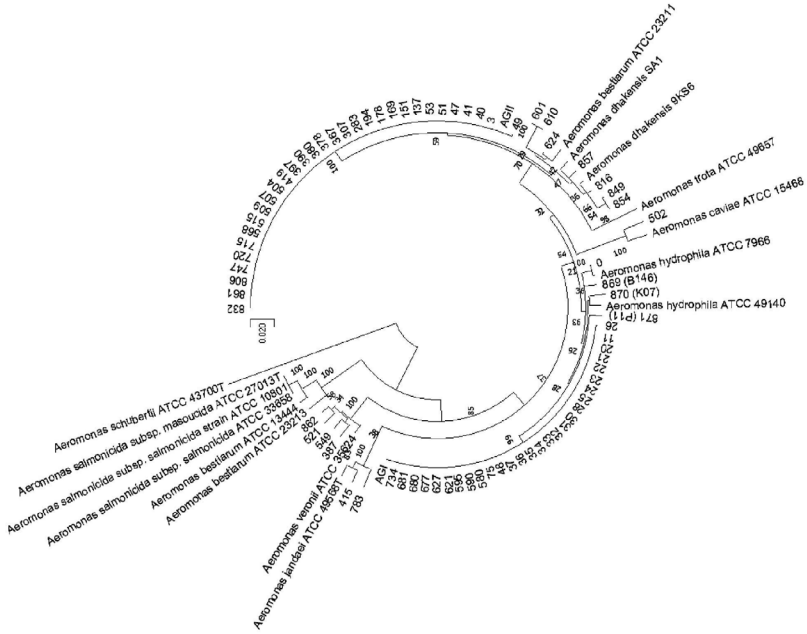
### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm được triển khai tại HCMBiotech trong thời gian từ tháng 4/2020 đến tháng 12/2022.

## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Thu thập và định danh chủng *Aeromonas* sp. gây bệnh trên cá tra tại Đồng bằng sông Cửu Long

Sau khi sàng lọc 296 khuẩn lạc từ 40 mẫu cá bệnh, chúng tôi thu được 70 khuẩn lạc dương tính với phản ứng PCR trên gen aerolysin; từ đó, nâng tổng số chủng *Aeromonas* spp. trong bộ sưu tập của HCMBiotech lên 332 chủng. Tổng cộng 77 chủng *Aeromonas* spp. được chọn để giải trình tự đoạn gen *gyrB* (984 bp). Dựa trên cây phân loài *gyrB*, 32 chủng có quan hệ gần với chủng *A. hydrophila*; 38 chủng có mối liên hệ di truyền gần gũi với các chủng *A. bestiarum*, *A. dhakensis* và *A. trota*; 04 chủng cùng nhóm với *A. veronii*; 02 chủng có quan hệ gần với *A. jandaei*; 01 chủng có quan hệ gần với *A. caviae* (Hình 1). Kết quả định danh cho thấy tác nhân chính gây bệnh xuất huyết trên cá tra gồm có *A. hydrophila* (chiếm 40%) và *A. dhakensis* (chiếm 49%). *A. dhakensis* là vi khuẩn gây nhiễm trùng ở người nhưng đáng ngạc nhiên là được phân lập rất nhiều từ mẫu cá tra bị bệnh. Điều này có thể có nguồn gốc từ tập tục nuôi cá tra và sinh hoạt con người tại vùng ĐBSCL, làm lan truyền chủng vi khuẩn gây bệnh từ người sang cá. Chính vì vậy, *A. dhakensis* cần được tập trung nghiên cứu để đưa ra biện pháp phòng ngừa dịch bệnh trên cá tra, tương tự như với các nghiên cứu hiện có đối với *A. hydrophila*.



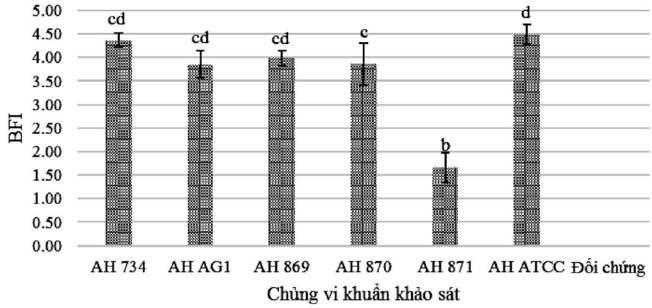

**Hình 1.** Cây phân loài của 77 chủng *Aeeromonas* spp. căn cứ trên trình tự gen *gyrB* (984 bp) bằng phương pháp Maximum Likelihood, mô hình Tamura-Nei, Gamma-Distributed 5, bootstrap 1.000

### 3.2. So sánh các yếu tố hình thành độc lực giữa *A. hydrophila* độc lực cao và *A. hydrophila* thông thường

Trong tổng số 332 chủng *Aeromonas* spp., chúng tôi phát hiện được 03 chủng *A. hydrophila* không có độc lực (non-vAh) và 83 chủng độc lực cao (vAh) bằng phương pháp PCR và nuôi cấy trên môi trường M9I. Căn cứ trên nghiên cứu trước đây về bộ gen và thử nghiệm độc lực *in vivo* bằng phương pháp gây bệnh thực nghiệm trên cá tra của các chủng *A. hydrophila* (Ngo *et al.*, 2022), hai chủng vAh (AH AG1 và AH 734) và ba chủng non-vAh (AH 869, AH 870, AH 871) được sử dụng để khảo sát khả năng tạo màng biofilm, khả năng di động và hoạt tính exoprotease nhằm xác định các yếu tố có tiềm năng liên quan đến độc lực.

#### *3.2.1. Khả năng tạo màng sinh học (biofilm)*

Chủng AH ATCC 7966 có giá trị BFI cao nhất (4,49 ± 0,2), và chủng AH 871 có giá trị BFI thấp nhất (1,66 ± 0,31) ($p < 0,05$) (Hình 2). Kết quả cho thấy không có khác biệt rõ ràng về khả năng hình thành màng sinh học liên quan đến độc lực của hai nhóm *A. hydrophila* (vAh và non-vAh).




**Hình 2.** Chỉ số hình thành màng sinh học (BFI) của các chủng *A. hydrophila* khảo sát

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với p < 0,05 (One-way ANOVA và Turkey multiple comparison test) giữa các chủng khảo sát.*

Sự hình thành màng sinh học có thể giúp vi khuẩn tăng cường sự ổn định, tăng khả năng thu nhận chất dinh dưỡng cho tế bào (Tsuchiya *et al.*, 2016), qua đó để bảo vệ chúng chống lại các yếu tố bên ngoài, tăng cơ hội sống sót (Peterson *et al.*, 2015). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng sự hình thành màng sinh học góp phần vào độc lực của vi khuẩn (Du *et al.*, 2016). Tuy nhiên, Du *et al.* (2016) đã tạo chủng *A. hydrophila* đột biến gen *pepF* liên quan đến quá trình tạo biofilm và nhận thấy khả năng hình thành màng biofilm của chủng đột biến tăng lên (p < 0,05) nhưng chủng lại mất độc lực. Do đó, nhóm tác giả kết luận khả năng hình thành màng sinh học không nhất thiết liên quan đến độc lực (Du *et al.*, 2016).

### *3.2.2. Khả năng di động*

Đối với khả năng bơi (Bảng 1), chủng AH 870 là chủng có khả năng bơi tốt nhất và ATCC 7966 là chủng có khả năng bơi kém nhất. Đối với các chủng non-vAh phân lập từ cá tra khả năng bơi dao động từ 14 ± 2 mm đến 60,67 ± 3,06 mm sau 24 giờ ủ và từ 44,67 ± 3,06 mm đến 90 ± 0,0 mm sau 48 giờ ủ. Trong khi đó các chủng vAh có khả năng bơi dao động từ 14,67 - 18,67 ± 1,15 mm sau 24 giờ ủ và từ 35,33 ± 2,31 mm đến 41,33 ± 1,15 mm sau 48 giờ ủ. Điều này cho thấy sau 48h ủ, nhóm vAh có khả năng bơi kém hơn so với nhóm non-vAh.

Đối với khả năng dịch chuyển bề mặt (Bảng 1), chủng non-vAh 869 có khả năng dịch chuyển tốt nhất (31,33 ± 3,06 mm), trong khi đó các chủng AH 870 và AH ATCC 7966 có khả năng dịch chuyển thấp nhất (18,67 ± 1,15 5). Sự khác biệt về khả năng dịch chuyển bề mặt giữa hai nhóm chủng vAh và non-vAh không được ghi nhận.

**Bảng 1.** Khả năng bơi (swimming mobility) và khả năng dịch chuyển bề mặt (swarming motility) của các chủng *A. hydrophila*

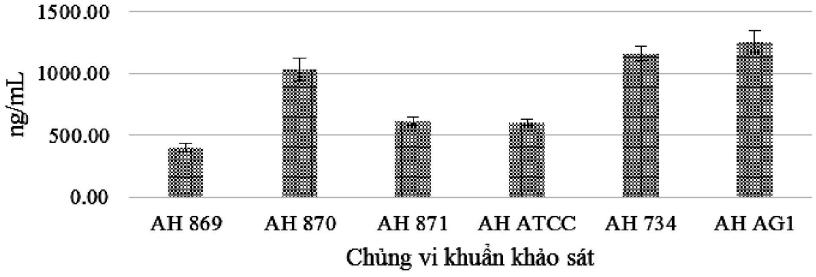
| Chủng | Khả năng bơi (mm) | | Khả năng dịch chuyển bề mặt (mm) |
|---|---|---|---|
| | *Ủ 24 giờ* | *Ủ 48 giờ* | |
| AH 869 | $14 \pm 2^{ab}$ | $44,67 \pm 3,06^{c}$ | $31,33 \pm 3,06^{c}$ |
| AH 870 | $60,67 \pm 3,06^{d}$ | $90 \pm 0,0^{e}$ | $18,67 \pm 1,15^{a}$ |
| AH 871 | $26,67 \pm 2,31^{c}$ | $52,67 \pm 3,06^{d}$ | $23,33 \pm 1,15^{ab}$ |
| AH ATCC 7966 | $11,33 \pm 1,15^{a}$ | $26 \pm 2,0^{a}$ | $18,67 \pm 1,15^{a}$ |
| AH 734 | $14,67 \pm 1,15^{ab}$ | $35,33 \pm 2,31^{b}$ | $29,33 \pm 2,31^{c}$ |
| AH AG1 | $18,67 \pm 1,15^{b}$ | $41,33 \pm 1,15^{bc}$ | $28,67 \pm 3,06^{bc}$ |

*Ghi chú: Các chữ cái khác nhau cùng một cột có biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với p < 0,05 (One-way ANOVA và Turkey multiple comparison test) giữa các chủng khảo sát.*

### *3.2.3. Hoạt tính exoprotease*

Kết quả cho thấy các chủng vAh có hoạt tính exoprotease (từ 1.159,53 ± 58,11 đến 1.256,76 ± 87,43 ng/mL) cao hơn so với các chủng non-vAh (từ 401,13 ± 34,14 đến 1.029,03 ± 93,99 ng/mL) (Hình 3). Kết quả này tương ứng với một số nghiên cứu

trước đây đã chỉ ra rằng hoạt độ exoprotease là một yếu tố trong độc lực của các chủng *Aeromonas*, chúng có tương quan với khả năng hình thành sự nhiễm trùng. Quá trình sản sinh exoprotease của vi khuẩn phụ thuộc vào các yếu tố môi trường như sắt, nitơ, nhiệt độ, pH, nồng độ oxy nhưng nhìn chung cần đạt mật độ quần thể tế bào nhất định để xảy ra (Swift *et al.*, 1999). Tuy nhiên, sự điều hòa hoạt động sản sinh exoprotease cũng rất quan trọng, vì nếu exoprotease được tiết ra quá sớm, vật chủ sẽ sớm tạo sự phòng vệ và ngăn chăn hiệu quả sự lây nhiễm. Các đột biến ở S-layer (Noonan và Trust, 1997), protease (Vipond *et al.*, 1998), hemolysin (Wong *et al.*, 1998) cho thấy *Aeromonas* spp. tăng độc lực khi mất khả năng tiết một hay nhiều yếu tố độc lực. Đây có thể là một trong những yếu tố giải thích tại sao chủng non-vAh AH 870 có hoạt tính exoprotease cao nhưng lại là chủng không có độc lực trên cá tra (Ngo *et al.*, 2022)




**Hình 3.** Hoạt tính exoproteases (ng/mL) của dịch nuôi cấy vi khuẩn *A. hydrophila* qua đêm

*Ghi chú: Các chữ cái (thường) giống nhau biểu thị sự khác biệt có ý nghĩa với p < 0,05 (One-way ANOVA và Turkey multiple comparison test).*

## IV. KẾT LUẬN

Qua kết quả định danh loài bằng gen *gyrB* của 77 chủng *Aeromonas* spp. gây bệnh xuất huyết trên cá tra, ngoài *A. hydrophila* vốn là tác nhân được quan tâm từ trước đến nay chúng tôi phát hiện có thêm sự hiện diện của *A. dhakensis*, chiếm 49% tổng số chủng vi khuẩn phân tích từ mẫu cá bệnh. Điều này cho thấy biện pháp phòng ngừa và điều trị bệnh xuất huyết ở cá tra cần hướng đến xử lý sự lây nhiễm của cả *A. hydrophila* và *A. dhakensis*. Khi so sánh một số kiểu hình liên quan khả năng gây bệnh giữa chủng *A. hydrophila* độc lực cao và chủng không độc lực thì chúng tôi nhận thấy khả năng tạo màng sinh học và khả năng bơi không có sự khác biệt giữa hai nhóm; khả năng dịch chuyển bề mặt của nhóm vAh kém hơn so với nhóm non-vAh sau 48h ủ, trong khi đó hoạt tính exoprotease của nhóm vAh cao hơn so với non-vAh.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 106.05.2019.340.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

**Du, H., Pang, M., Dong, Y., Wu, Y., Wang, N., Liu, J., Awan, F., Lu, C., Liu, Y.,** 2016. Identification and characterization of an *Aeromonas hydrophila* oligopeptidase gene *pepF* negatively related to biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1497.

**Griffin, M.J., Goodwin, A.E., Merry, G.E., Liles, M.R., Williams, M.A., Ware, C., Waldbieser, G.C.,** 2013. Rapid quantitative detection of *Aeromonas hydrophila* strains associated with disease outbreaks in catfish aquaculture. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 25: 473-481.

**Jahid, I.K., Lee, N.-Y., Kim, A., Ha, S.-D.,** 2013. Influence of glucose concentrations on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Food Protection*, 76: 239-247.

**Lowry, R., Balboa, S., Parker, J.L., Shaw, J.G.,** 2014. *Aeromonas* flagella and colonisation mechanisms. *Advances in Microbial Physiology*, 65: 203-256.

**Ngo, T.P., Vu, H.T., Le, T.T., Bui, H.C., Liles, M.R., Rodkhum, C.,** 2022. Comparative genomic analysis of hypervirulent *Aeromonas hydrophila* strains from striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Vietnam. *Aquaculture*, 558: 738364.

**Noonan, B., Trust, T.J.,** 1997. The synthesis, secretion and role in virulence of the paracrystalline surface protein layers of *Aeromonas salmonicida* and *A. hydrophila*. *FEMS Microbiology Letters*, 154: 1-7.

**Panangala, V.S., Shoemaker, C.A., Van Santen, V.L., Dybvig, K., Klesius, P.H.,** 2007. Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens,

*Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 74: 199-208.

**Pang, M., Jiang, J., Xie, X., Wu, Y., Dong, Y., Kwok, A., Zhang, W., Yao, H., Lu, C., Leung, F.,** 2015. Novel insights into the pathogenicity of epidemic *Aeromonas hydrophila* ST251 clones from comparative genomics. *Scientific Reports*: 1-15.

**Parsek, M.R., Singh, P.K.,** 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Reviews in Microbiology,* 57: 677-701.

**Peterson, B.W., He, Y., Ren, Y., Zerdoum, A., Libera, M.R., Sharma, P.K., Van Winkelhoff, A.-J., Neut, D., Stoodley, P., Van Der Mei, H.C.,** 2015. Viscoelasticity of biofilms and their recalcitrance to mechanical and chemical challenges. *FEMS Microbiology Reviews*, 39: 234-245.

**Sakimura, T., Kajiyama, S., Adachi, S., Chiba, K., Yonekura, A., Tomita, M., Koseki, H., Miyamoto, T., Tsurumoto, T., Osaki, M.,** 2015. Biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* expressing vancomycin resistance early after adhesion to a metal surface. *BioMed Research International,* 2015: 943056.

**Soler, L., Yanez, M., Chacon, M., Aguilera-Arreola, M.G., Catalán, V., Figueras, M., Martínez-Murcia, A.,** 2004. Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54: 1511-1519.

**Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kämpfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Trüper, H.G.,** 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52: 1043-1047.

**Swift, S., Lynch, M.J., Fish, L., Kirke, D.F., Tomás, J.M., Stewart, G.S., Williams, P.,** 1999. Quorum sensing-dependent regulation and blockade of exoprotease production in *Aeromonas hydrophila*. *Infection and Immunity*, 67: 5192-5199.

**Talagrand-Reboul, E., Jumas-Bilak, E., Lamy, B.,** 2017. The social life of *Aeromonas* through biofilm and quorum sensing systems. *Frontiers in Microbiology*, 8: 37.

**Tekedar, H.C., Waldbieser, G.C., Karsi, A., Liles, M.R., Griffin, M.J., Vamenta, S., Sonstegard, T., Hossain, M., Schroeder, S.G., Khoo, L.,** 2013. Complete genome sequence of a channel catfish epidemic isolate, *Aeromonas hydrophila* strain ML09-119. *Genome Announcements*, 1: e00755-00713.

**Tsuchiya, Y., Eda, S., Kiriyama, C., Asada, T., Morisaki, H.,** 2016. Analysis of dissolved organic nutrients in the interstitial water of natural biofilms. *Microbial Ecology*, 72: 85-95.

**Vipond, R., Bricknell, I.R., Durant, E., Bowden, T.J., Ellis, A.E., Smith, M., MacIntyre, S.,** 1998. Defined deletion mutants demonstrate that the major secreted toxins are not essential for the virulence of *Aeromonas salmonicida*. *Infection and Immunity*, 66: 1990-1998.

**Watanabe, K., Nelson, J., Harayama, S., Kasai, H.,** 2001. ICB database: the *gyrB* database for identification and classification of bacteria. *Nucleic Acids Research*, 29: 344-345.

**Wong, C.Y., Heuzenroeder, M.W., Flower, R.L.,** 1998. Inactivation of two haemolytic toxin genes in *Aeromonas hydrophila* attenuates virulence in a suckling mouse model. *Microbiology*, 144: 291-298.

## Occurrence of *Aeromonas* spp. in motile aeromonas septicemia infected catfish and initial investigation of phenotypes related to pathogenicity of *Aeromonas hydrophila*

Le Thi Thu Thao, Vu Thi Thanh Huong, Bui Nguyen Chi Hieu,
Ho Phu Khanh, Phan Đo Trong Nghia, Ngo Huynh Phuong Thao

**Abstract**

*Aeromonas* spp. is a causative agent of motile Aeromonas septicemia (MAS) in aquatic animals, however, species determination of *Aeromonas* spp. using PCR has shown low accuracy. By sequencing *gyrB* gene, 40% of *Aeromonas* spp. out of a total of 77 isolates from diseased catfish were *A. hydrophila* and 49% of them were *A. dhakensis*. These findings suggest that *A. dhakensis* is also one of main pathogens causing MAS in catfish, together with *A. hydrophila*. Among 332 *Aeromonas* spp. isolates examined, 83 hypervirulent *A. hydrophila* isolates (vAh) and 03 regular *A. hydrophila* isolates (non-vAh) were recorded. Testing some phenotypes relating to pathogenicity in these two groups, vAh strains exhibited higher exoprotease activities and lower swimming ability after 48 h-incubation, compared to non-vAh strains. Biofilm forming ability of vAh and non-vAh strains showed no significant difference.

**Keywords:** Catfish, motile aeromonas septicemia, *Aeromonas* spp., *gyrB*, biofilm, exoprotease

Ngày nhận bài: 13/02/2023 Người phản biện: TS. Lê Hồng Phước
Ngày phản biện: 03/3/2023 Ngày duyệt đăng: 28/3/2023