

DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.049

PHÂN LẬP, ĐỊNH DANH VÀ ĐẶC ĐIỂM CỦA VI KHUẨN *Aeromonas schubertii* GÂY BỆNH ĐÓM TRẮNG NỘI TẠNG TRÊN CÁ LÓC (*Channa striata*) Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Từ Thanh Dung*, Lê Minh Khôi và Nguyễn Bảo Trung

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Từ Thanh Dung (email: ttdung@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 08/08/2018

Ngày nhận bài sửa: 06/10/2018

Ngày duyệt đăng: 26/04/2019

Title:

Isolation, identification and characterization of *Aeromonas schubertii* causing internal white spot on snakehead fish (*Channa striata*) in the Mekong Delta of Vietnam

Từ khóa:

Aeromonas schubertii, cảm nhiễm, *Channa striata*, mô bệnh học

Keywords:

Aeromonas schubertii, *Channa striata*, histopathology, infection

ABSTRACT

The bacterium *Aeromonas schubertii*, was isolated and identified as the aetiological agent causing internal white spot disease in snakehead fish (*Channa striata*) suffering from high mortality rates within hatchery and commercial farms in 4 provinces: Tra Vinh, An Giang, Dong Thap and Dong Nai. A total of 192 diseased specimens showing white-spot in internal organs was collected from 53 different farms. The typical clinical signs were observed the presence of whitish nodules in the liver, spleen and kidney. The bacteria were isolated with tiny pale yellow colonies on tryptic soya agar after incubating at 28°C for 24-36 hours, and were analyzed as negative Gram and short rod-shaped, motile and oxidase positive. A combination of conventional biochemical tests, API 20E system and 16S rRNA gene partial sequencing was used to identify the all isolates as *Aeromonas schubertii*. An experimental injection challenge study was performed and fulfilled Koch's postulates with LD₅₀ values of 6.59x10³ and 8.12x10³ cfu per ml. Histological examination was found numerous multifocal granulomas in internal organ tissues: liver, spleen and kidney.

TÓM TẮT

Vi khuẩn *Aeromonas schubertii* được phân lập và định danh là tác nhân gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa striata*) gây thiệt hại nghiêm trọng với tỉ lệ hao hụt cao trong các trại giống và ao nuôi thâm canh ở 4 tỉnh như: Trà Vinh, An Giang, Đồng Tháp và Đồng Nai. Tổng số 192 mẫu cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng được thu từ 53 ao nuôi khác nhau. Dấu hiệu bệnh lý đặc trưng có các đốm trắng nhỏ ở gan, thận và tỳ tạng. Trên môi trường TSA, vi khuẩn có khuẩn lạc nhỏ màu vàng nhạt, sau 24-36 giờ ủ ở nhiệt độ 28°C, và là vi khuẩn Gram âm, hình que ngắn, di động và oxidase dương tính. Dựa vào đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa, kit API 20E và kết quả giải trình tự gen 16S rRNA, vi khuẩn này được xác định là loài *Aeromonas schubertii*. Thí nghiệm cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm cho thấy vi khuẩn có khả năng gây bệnh với dấu hiệu bệnh lý giống như ngoài ao nuôi, với giá trị LD₅₀ của hai chủng vi khuẩn thí nghiệm là 6,59x10³ CFU/mL và 8,12x10³ CFU/mL, kết quả này thỏa mãn với định đề Koch. Kết quả kiểm tra mô bệnh học đã quan sát được các u hạt với nhiều hình dạng khác nhau ở mẫu mô gan, thận và tỳ tạng.

Trích dẫn: Từ Thanh Dung, Lê Minh Khôi và Nguyễn Bảo Trung, 2019. Phân lập, định danh và đặc điểm của vi khuẩn *Aeromonas schubertii* gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa striata*) ở Đồng bằng sông Cửu Long. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(2B): 69-78.

1 GIỚI THIỆU

Cá lóc (*Channa striata*) phân bố rộng trong tự nhiên và thường thấy ở các thủy vực nước ngọt, do tăng trưởng nhanh và thịt cá, thơm ngon là loại thực phẩm có giá trị dinh dưỡng cao, ít xương nên được nhiều người ưa thích. Cá lóc ngày càng được nuôi phổ biến không những ở Đồng bằng sông Cửu Long mà còn trên cả nước và nhiều nước khác ở châu Á. Tuy nhiên, ở ĐBSCL các mô hình nuôi cá lóc chủ yếu là tự phát, để đạt được sản lượng và lợi nhuận cao nhất, mức độ thâm canh hóa càng được tăng lên, dẫn đến nhiều dịch bệnh phát sinh gây thiệt hại lớn cho nông dân cũng như công tác phòng trị bệnh ngày càng khó khăn (Sinh *et al.*, 2014). Trong các bệnh truyền nhiễm trên cá, nhóm vi khuẩn *Aeromonas* từ lâu được xem là nhóm vi khuẩn gây bệnh phổ biến nhất trên các loài cá nước ngọt nói chung và trên cá lóc nói riêng. Đã có nhiều nơi trên thế giới ghi nhận được sự ảnh hưởng của nhóm *Aeromonas* đến cá lóc nuôi như vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* được ghi nhận trên cá lóc tại Ấn Độ (Rajendiranne *et al.*, 2008), Malaysia (Talpur *et al.*, 2014), *Aeromonas veronii* được phân lập trên loài cá lóc (*Ophiocephalus argus*) Trung Quốc (Zheng *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2013). Đặc biệt, loài *Aeromonas schubertii* có khả năng gây nhiễm trùng huyết trên người được phân lập định danh lần đầu bởi Hickman-Benner *et al.*, (1988), cũng được phát hiện loài vi khuẩn này gây thiệt hại đáng kể trên hai loài cá lóc *Ophiocephalus argus* và *Channa maculata* tại Trung Quốc (Chen *et al.*, 2012; Liu and Li, 2012). Việc phát hiện các mầm bệnh truyền nhiễm đối với cá là ưu tiên hàng đầu cho việc quản lý sức khỏe thủy sản (Maurilio *et al.*, 2014). Tại Việt Nam, bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc được ghi nhận quanh năm, có tỉ lệ hao hụt cao, nhất là trong giai đoạn cá giống. Thông tin khoa học về bệnh này trên cá lóc đến nay vẫn còn rời rạc và hạn chế. Nghiên cứu thực hiện nhằm xác định tác nhân gây bệnh, đặc điểm bệnh học của bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa striata*) ở ĐBSCL, để cung cấp thông tin khoa học cho công tác quản lý dịch bệnh trong nuôi trồng thủy sản.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Kiểm tra bệnh cá

Mẫu cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng được thu từ 53 ao nuôi thâm canh ở 4 tỉnh Trà Vinh, An Giang, Đồng Tháp và Đồng Nai (từ tháng 9 năm 2016 đến tháng 2 năm 2018). Tổng số mẫu bao gồm 192 mẫu cá lóc có biểu hiện bệnh đốm trắng nội tạng và 35 cá khỏe trọng lượng 50-500 g, được kiểm tra ký sinh trùng, dấu hiệu bệnh lý bên ngoài và trong tại ao nuôi. Các thông tin về ao nuôi cũng như dấu hiệu lâm sàng được ghi nhận. Mẫu cá lóc bệnh đốm trắng

nội tạng được tiến hành phân lập vi sinh dựa theo cẩm nang của Frerichs and Millar (1993). Các mẫu gan, thận, tỳ tạng được cấy trên môi trường tryptic soy agar (TSA, Merck) trực tiếp tại địa điểm thu mẫu. Sau đó, ủ trong tủ ấm ở 28°C trong 24 – 36 giờ và phân tích tại Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Phân lập và định danh vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn thuần được phân lập từ cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng, phát triển trên môi trường TSA được kiểm tra các chỉ tiêu cơ bản như: nhuộm Gram, tính di động, oxidase, catalase, phản ứng O/F và khả năng dung huyết trên môi trường thạch BA (Blood agar) có chứa 5% máu cừu.

Phương pháp định danh vi khuẩn: so sánh được dựa vào các chỉ tiêu hình thái, sinh lý, sinh hóa theo cẩm nang của Frerichs and Millar (1993), Buller (2004), bộ kit API 20E và ứng dụng phương pháp sinh học phân tử giải trình tự gen 16S rRNA tại công ty Macrogen, Hàn Quốc (www.macrogen.com). Kết quả giải trình tự các dòng vi khuẩn được so sánh độ tương đồng với các trình tự trên ngân hàng dữ liệu NCBI (National Center for Biotechnology Information) bằng chương trình BLASTn. Các trình tự sau đó được so sánh cặp với nhau (multialignment) bằng chương trình CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1997).

Kiểm tra nhiệt độ và độ mặn ảnh hưởng đến khả năng phát triển của vi khuẩn

Trong điều kiện biến đổi khí hậu, có thể một số chỉ tiêu môi trường trực tiếp hoặc gián tiếp ảnh hưởng đến sự phát triển của mầm bệnh, đặc biệt là vi khuẩn. Để kiểm tra nhiệt độ và độ mặn ảnh hưởng đến khả năng phát triển của vi khuẩn dẫn đến khả năng gây bệnh (độc lực) của vi khuẩn điển hình là 2 chỉ tiêu nhiệt độ và độ mặn. Nghiên cứu này đã chọn đại diện 6 chủng vi khuẩn phân lập theo vùng nhiễm mặn: 2 chủng ở An Giang và 4 chủng ở Trà Vinh (2 chủng ở huyện Châu Thành và 2 chủng huyện Trà Cú).

– Ảnh hưởng của nhiệt độ: Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong 3 mL môi trường BHI-B và ủ ở các mức nhiệt độ 5°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C. Sau khi được ủ trong 24 giờ vi khuẩn được đo độ đục bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng OD = 610 nm (Chen *et al.*, 2012).

– Ảnh hưởng của độ mặn: 3 mL vi khuẩn được nuôi trong ống nghiệm chứa môi trường BHI-B và có nồng độ muối NaCl tăng dần từ 0%; 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%; 3%; 3,5%; 4%; 4,5%; 5%; 5,5% và 6%. Kết quả được đọc bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng OD = 610 nm sau 24 giờ nuôi (Chen *et al.*, 2012).

2.3 Thí nghiệm cảm nhiễm xác định LD₅₀ vi khuẩn gây bệnh

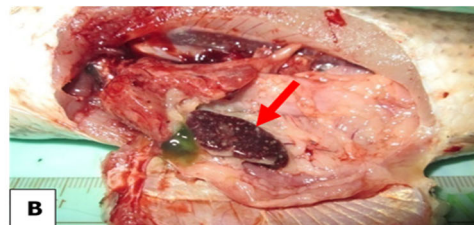
Cá thí nghiệm: Cá lóc giống khỏe có trọng lượng 9±1,2 gram/con. Trước khi gây cảm nhiễm, cá được kiểm tra sức khỏe để đảm bảo hoàn toàn không nhiễm bệnh truyền nhiễm (kí sinh trùng, nấm, vi khuẩn, ...), sau đó bố trí thí nghiệm gây cảm nhiễm trên hệ thống bể nhựa (60 L). Các bể sau khi được tiệt trùng và rửa sạch, cho nước vào bể (40 L), sục khí liên tục để loại hết dư lượng chlorine. Cá được thuần dưỡng trong điều kiện thí nghiệm 2 tuần với mật độ 10 con/bể. Suốt thời gian thí nghiệm được bổ sung sục khí và cho ăn hai lần trong ngày. Thí nghiệm được tiến hành ở khu thực nghiệm tại Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

Vi khuẩn gây cảm nhiễm: SCL30 và STC56 phân lập từ cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng tại ao nuôi được sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm. Sau khi vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường brain-heart infusion broth (BHI-lông) trên máy lắc ở 28°C trong 24 giờ, tiến hành ly tâm 13000 vòng ở 4°C trong 10 phút, sau đó rửa lại với dung dịch nước muối sinh lý tiệt trùng (0,85% NaCl), lặp lại trong 2 lần. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng cách đo ở bước sóng 610 nm (OD= 0,1±0,02). Sau đó pha loãng vi khuẩn thành các nồng độ cần sử dụng để tiến hành gây cảm nhiễm cho cá. Cho 0,1 mL dung dịch vi khuẩn vừa pha lên đĩa TSA trải đều, đem ủ ở 28°C. Sau đó pha loãng trên BHI-agar và đếm khuẩn lạc sau 36 giờ ở 28°C.

Bảng 1: Mật độ vi khuẩn sử dụng thí nghiệm cảm nhiễm

Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)
SCL30	3,17×10 ² ; 3,17×10 ³ ; 3,17×10 ⁴ ; 3,17×10 ⁵
STC56	1,29×10 ² ; 1,29×10 ³ ; 1,29×10 ⁴ ; 1,29×10 ⁵

Phương pháp cảm nhiễm: Cá thí nghiệm được tiêm vi khuẩn vào xoang bụng với liều 0,1 mL/cá tương ứng mật độ vi khuẩn ở Bảng 1. Riêng nghiệm thức đối chứng được tiêm nước muối sinh lý tiệt



Hình 1: Dấu hiệu bệnh lý cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng, (A) Xuất huyết điểm trên thân và dưới bụng, (B) Đốm trắng trên gan, thận và tỳ tạng cá lóc bệnh (mũi tên)

Dấu hiệu bệnh lý bên trong: biểu hiện đặc trưng là xuất hiện nhiều đốm trắng nhỏ tập trung chủ yếu

trùng (0,85% NaCl, không có vi khuẩn). Tất cả các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Cá sau khi gây cảm nhiễm được theo dõi số lượng, thời điểm cá chết và các dấu hiệu lâm sàng trong suốt 14 ngày. Nước được thay mỗi ngày và nhiệt độ nước biến động trong khoảng 28- 31°C. Cá lờ đờ hay vừa mới chết được quan sát dấu hiệu bệnh lý bên ngoài và bên trong nội quan, đồng thời được phân lập vi khuẩn ở gan, thận, tỳ tạng trên môi trường TSA và định danh. Khi kết thúc thí nghiệm, giá trị LD₅₀ được xác định theo phương pháp của Reed & Muench (1938). Số liệu được phân tích bằng chương trình Microsoft Excel.

2.4 Phương pháp phân tích mô bệnh học

Nghiên cứu mô bệnh học nhằm quan sát các biến đổi mô học ở mức độ tế bào, phân tích được thực hiện và đọc kết quả dựa theo Ferguson (2006). Mẫu cơ quan gan, thận và tỳ tạng được cố định trong dung dịch formol trung tính 10% trong 24 giờ. Sau khi cố định mẫu được rửa sạch và chuyển sang dung dịch cồn 70% trừ mô để thực hiện cắt tia định hướng độ dày 1 cm và cho vào máy xử lí mẫu tự động. Sau đó mẫu được đúc khối, cắt lát mỏng 4 µm, dán mẫu lên lame, ủ tại bàn ấm ở 35°C trong 12 giờ. Tiếp theo, mẫu được nhuộm theo phương pháp nhuộm Harris’s Hematoxylin & Eosin (H&E). Mẫu được đọc và ghi nhận ở các vật kính 10X, 20X và 40X.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Dấu hiệu bệnh lý

Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài: Cá bệnh có các biểu hiện chung như giảm ăn, bơi lờ đờ trên mặt ao. Cá bệnh nhẹ có các mảng trắng lớn trên thân. Một số trường hợp bệnh nặng hơn có thể xuất huyết điểm ở thân và xuất huyết vây ngực. Bệnh thường xuất hiện nhiều trên cá giống chiếm tỉ lệ trên 50%. Ngoài ra, một số tác nhân cơ hội như nấm và kí sinh trùng cũng có thể lây nhiễm khi cá mắc bệnh đốm trắng nội tạng, làm xuất hiện nhiều dạng dấu hiệu bệnh lý khác nhau đi kèm (5-10%) như lở loét, mòn đuôi, trắng mang... dễ gây nhầm lẫn khi chẩn đoán (Hình 1A).

ở thận và tỳ tạng, một số ít trường hợp bệnh nặng có thể thấy các đốm trắng nhỏ trên gan hoặc có thể đi

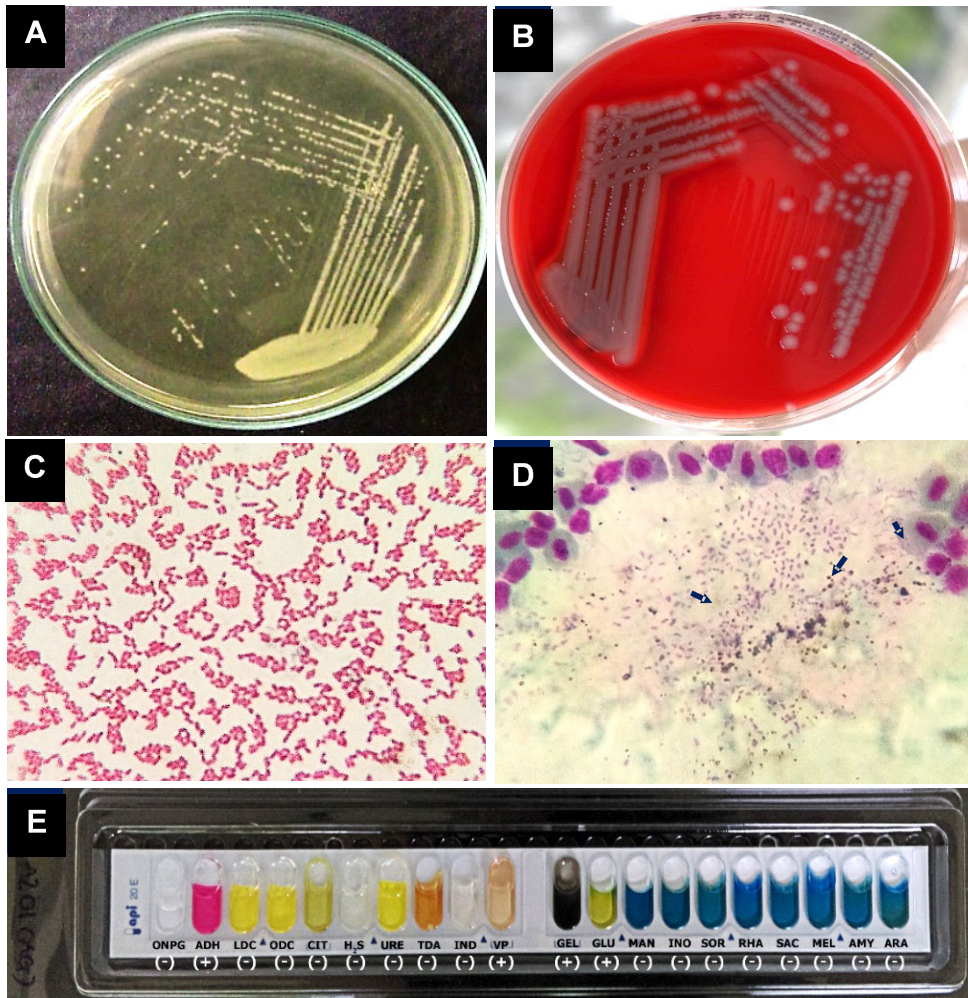
kèm sung, sậm màu và xuất huyết nội quan (Hình 1B).

Nhiều nghiên cứu cho thấy, bệnh đốm trắng nội quan cũng thường được ghi nhận trên nhiều loại cá khác nhau và tác nhân gây bệnh cũng có sự khác nhau trên từng loài như: cá vược vằn (*Morone saxatilis*) nhiễm vi khuẩn *Mycobacterium marinum* gây mù ở gan, thận, tỳ tạng (Gauthier *et al.*, 2003). Trên cá tra, bệnh gan thận mù (đốm trắng nội tạng) là do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (Dung *et al.*, 2008). Cá chim vây vàng (*Trachinotus blochii*) nhiễm vi khuẩn *Nocardia* spp. tạo các u hạt trên xương và đốm trắng trong gan, thận, tỳ tạng (Nguyễn Thị Thùy Giang *và ctv.*, 2013). Theo nghiên cứu của Liu and Li (2012), cá lóc nhiễm vi khuẩn *Aeromonas schubertii* tại Trung Quốc cũng ghi nhận được những dấu hiệu bệnh lí tương tự, tỉ lệ

hao hụt tích lũy của bệnh gây ra trên ao nuôi trong 40 ngày lên đến 45%. Vì vậy, tìm ra tác nhân chính gây bệnh sẽ giúp tìm ra giải pháp điều trị hiệu quả và quản lý dịch bệnh phù hợp.

3.2 Phân lập và định danh tác nhân gây bệnh

Kiểm tra đặc điểm cơ bản của vi khuẩn: Tổng cộng 55 chủng vi khuẩn được phân lập từ gan, thận, tỳ tạng của cá bệnh đốm trắng nội tạng trên môi trường TSA. Khuẩn lạc có màu vàng nhạt, tròn đều, lồi, có đường kính khá nhỏ 0,5-1,5 mm, phát triển sau 24-36 giờ ủ ở nhiệt độ 28°C (Hình 2A), kích thước khuẩn lạc có thể đạt tối đa từ 1,5-2 mm sau 48 giờ ủ. Quan sát dưới vật kính 100X, vi khuẩn bắt màu Gram âm, có dạng que ngắn, hai đầu tròn (Hình 2C). Vi khuẩn có khả năng di động, phản ứng dương tính với oxidase và catalase, có khả năng lên men glucose trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí.



Hình 2: Đặc điểm vi khuẩn phân lập

(A) Khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường TSA (sau 24 giờ, ở nhiệt độ 28°C); (B) Khuẩn lạc vi khuẩn trên BA (dung huyết dạng β); (C) Hình dạng vi khuẩn nhuộm Gram (100X); (D) Hình dạng vi khuẩn (mũi tên) trên mẫu kính phết thận cá lóc bệnh nhuộm Giemsa (100X); (E) Kết quả định danh vi khuẩn phân lập bằng kit API 20E

Vi khuẩn có khả năng phát triển và gây tan huyết (dung huyết dạng β) trên môi trường có chứa 5% máu cừu (Hình 2B). Xét nghiệm phết kính mẫu máu và thận của cá bệnh bằng cách soi tươi nhuộm Gram

và nhuộm Giemsa đều thấy rất nhiều vi khuẩn dạng hình que ngắn (Hình 2D) nằm rải rác trên vùng mô phết kính hoặc tập trung thành từng cụm. Ở một số mẫu thận cá bệnh, vi khuẩn xâm nhập, phá vỡ tế bào.

Bảng 2: Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập từ cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng

Chỉ tiêu	SCL30 (Phân lập)	STC56 (Phân lập)	<i>A. schubertii</i> (Chen <i>et al.</i> , 2012)	<i>A. schubertii</i> ATCC 43700T ^a
Nhuộm Gram	-	-	-	-
Khuẩn lạc (mm)	0,5-1,5	0,5-1,5	0,3-1	0,3-1
Thời gian ủ (giờ)	36-48	36-48	48	48
Hình dạng	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn
Oxidase	+	+	+	+
Môi trường máu	+	+	+	
Tan huyết				
Catalase	+	+	+	+
Di động	+	+	+	+
O/F	+	+	+	+
1% NaCl	+	+	+	+
6% NaCl	-	-	-	-
5°C	-	-	-	N
30°C	+	+	+	N
45°C	+/-	+/-	+/-	N
Lactose	-	-	-	-
Arginine	+	+	-	-
Dihydrolase				
Lysine decarboxylase	-	-	-	+
Ornithine decarboxylase	-	-	-	-
Citrate utilization	-	-	-	N
H ₂ S production	-	-	-	-
Urease	-	-	+/-	-
Tryptophane	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-
Voges proskauer	+	+	-	-
Gelatinase	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Manniton	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-
Saccharose	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-
Amygdalin	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-

Chú thích: +: dương tính; -: âm tính; +/-: có thể dương tính hoặc âm tính.

Định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20E: Kết quả cho thấy 6 chủng vi khuẩn phân lập cho phản ứng dương tính với các chỉ tiêu arginine dihydrolase, voges droskauer, gelatinase, glucose; các chỉ tiêu lactose, lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase, citrate utilization, H₂S production, urease, tryptophane, indole production, mannitol, inositol, sorbitol, rhamnose, saccharose, melibiose, amygdalin, arabinose cho ra phản ứng âm tính. Khi kiểm tra kết quả trên phần mềm tra cứu kit API 20E xác định được vi khuẩn phân lập được trên cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng thuộc giống *Aeromonas* spp. Như vậy, khi sử dụng bộ kit API 20E không định danh được đến loài của vi khuẩn *A. schubertii* (Hình 2E và Bảng 2). Nhiều nghiên cứu đã xác định, cả 2 vi khuẩn *A. schubertii* và *A. jandaei* có nhiều đặc điểm sinh học tương đồng với *A. hydrophila*. Do đó, chỉ dựa vào đặc điểm sinh lý, sinh hóa và bộ kit

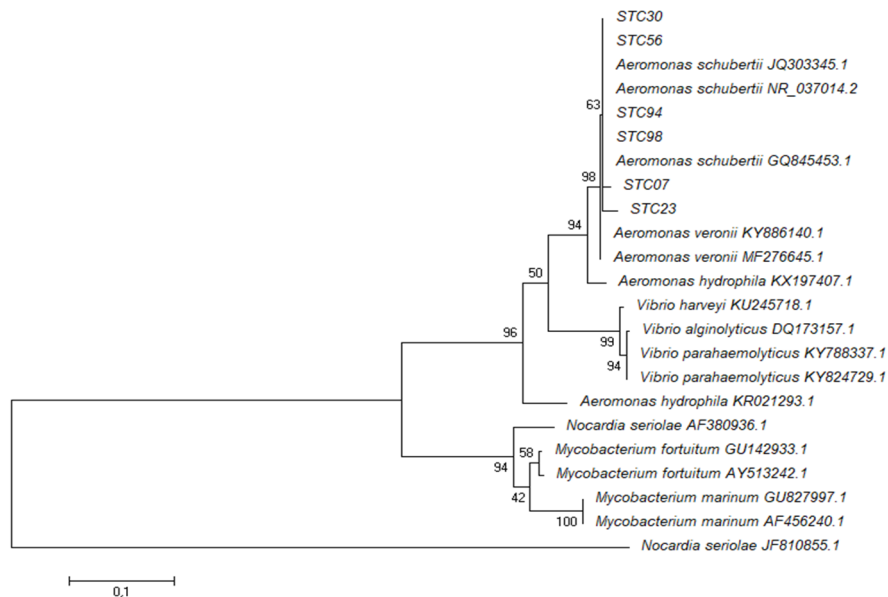
Định danh bằng kỹ thuật giải trình tự gen: Kết quả giải trình tự gen 16S rRNA và được tra cứu trên ngân hàng Gen bằng chương trình Blast Search đã xác định được cả 6 chủng vi khuẩn phân lập được chọn đại diện (STC94, STC98, SCL30, STC56, STC07 và STC23).

Kết quả đã xây dựng cây phả hệ giữa các chủng vi khuẩn bằng phương pháp Maximum Likelihood (Hình 4). Cây phả hệ giúp xác định được mối quan hệ di truyền trong quá trình tiến hóa của các loài được đề xuất bởi Tagle *et al.* (1988). Tiềm ích của nó gồm hai phần: bảo tồn tiến hóa và giúp củng cố dự đoán liên kết giữa các loài cũng như phát hiện ra loài

API 20E sẽ rất dễ gây ra sự nhầm lẫn và sai sót khi định danh nhóm vi khuẩn này (Carnaha *et al.*, 1989; Carnaha *et al.*, 1991). Mặt khác, khác với vi khuẩn *A. schubertii*, về hình thái vi khuẩn *A. hydrophila* có khuẩn lạc lớn (3 mm) sau 24 giờ ở nhiệt độ 28°C, có dạng tròn, rìa đều hơi lồi, ướt, nhẵn bóng, màu vàng kem (Buller, 2004). Trong khi, khuẩn lạc của vi khuẩn *A. schubertii* trong nghiên cứu này có đường kính khá nhỏ (0,5-1,5 mm) và xuất hiện sau 24-36 giờ ở nhiệt độ 28°C. Khuẩn lạc có màu vàng nhạt, tròn đều và lồi. Ngoài ra, *A. schubertii* có những khác biệt về đặc điểm sinh hóa với các loài trong giống *Aeromonas* khác do vi khuẩn này không có khả năng lên men đường D-mannitol và không sản sinh được iodine trong quá trình chuyển hóa L-tryptophan (Carol *et al.*, 1993). Chính vì thế, trong nghiên cứu này đã ứng dụng giải trình tự gen 16S rRNA để đảm bảo kết quả định danh.

mới (Duret and Bucher, 1997). Xác định, các chủng phân lập có trình tự gen tương đồng là 99% với chủng vi khuẩn chuẩn *Aeromonas schubertii* khi so sánh trên ngân hàng gen. Các nghiên cứu trước đây đã sử dụng phương pháp này để định danh loài vi khuẩn *A. schubertii* với tỉ lệ tương đồng là 99% (Chen *et al.*, 2012; Liu and Li, 2012).

Như vậy, sau khi kiểm tra các đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa và giải trình tự gen 16S rRNA đã xác định được vi khuẩn gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc trong nghiên cứu này là *Aeromonas schubertii*.

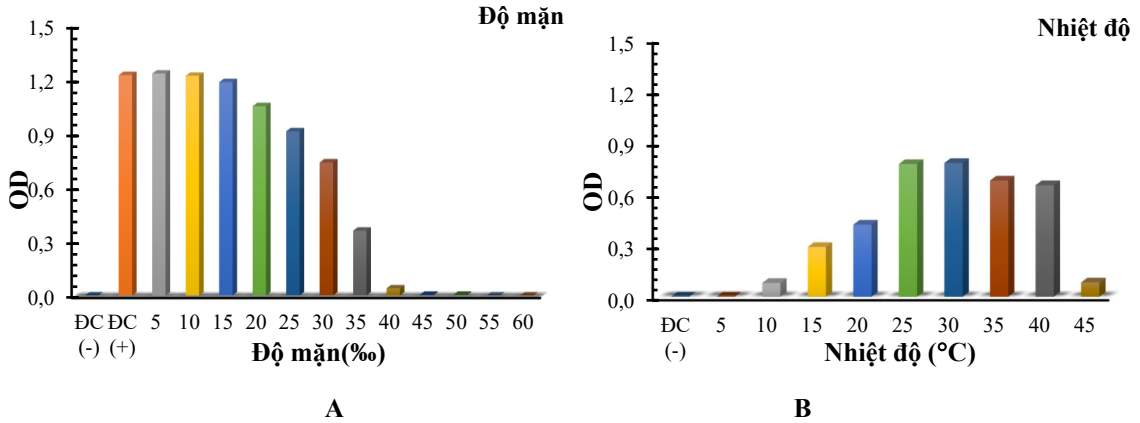


Hình 4: Cây phả hệ các chủng *Aeromonas schubertii* phân lập trên cá lóc bệnh “đốm trắng nội tạng”

Kết quả kiểm tra nhiệt độ và độ mặn ảnh hưởng của đến khả năng phát triển của vi khuẩn *Aeromonas schubertii*

Đa số các chủng vi khuẩn phân lập phát triển trên môi trường dinh dưỡng BHI lỏng có độ mặn từ 0% đến 3,5%, chỉ riêng một số chủng ở vùng nhiễm mặn Trà Cú (SCL30 và STC56) phát triển ở độ mặn 4% (Hình 5A). Tuy nhiên, phát triển tốt nhất ở độ mặn từ 0% đến 1,5%. Kết quả này tương tự với mô tả của Chen *et al.* (2012). Mặt khác, các chủng vi khuẩn *A.*

schubertii gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc có thể phát triển trong khoảng nhiệt độ biến động từ 10°C đến 45°C, phát triển mạnh nhất ở 25-30°C (Hình 5B). Ở Nam Trung Quốc, theo Chen *et al.* (2012), vi khuẩn *A. schubertii* gây bệnh trên cá lóc (*Channa maculata*) có khả năng phát triển trong khoảng nhiệt rộng hơn từ 5°C đến 45°C. Điều này cho thấy sự biến đổi khí hậu ở ĐBSCL nóng dần lên trong thời gian qua đã có ảnh hưởng trực tiếp hoặc gián tiếp lên khả năng phát triển của mầm bệnh vi khuẩn.

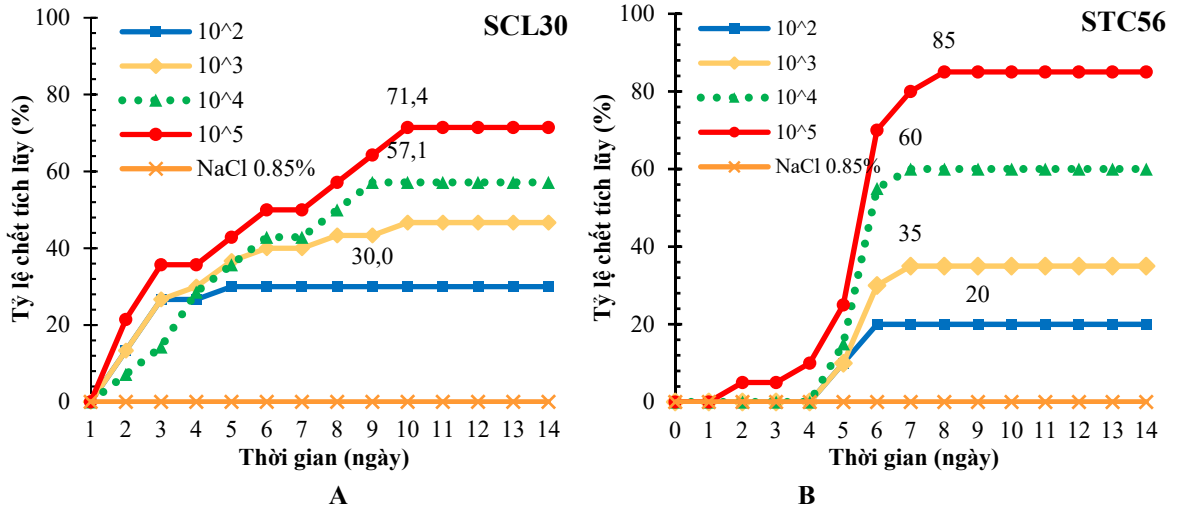


Hình 5: Kết quả kiểm tra khả năng phát triển của vi khuẩn *A. schubertii* ở các độ mặn (A) và nhiệt độ (B) khác nhau

3.3 Khả năng gây bệnh đốm trắng nội tạng của vi khuẩn phân lập

Hai chủng vi khuẩn *A. schubertii* SCL30 và STC56 phân lập để thực hiện thí nghiệm cảm nhiễm. Quan sát các chỉ tiêu về tỉ lệ chết, thời điểm gây chết

và dừng chết. Nhìn chung, có sự khác biệt giữa hai chủng vi khuẩn *A. schubertii* SCL30 và STC56, ở các nồng độ cảm nhiễm khác nhau thì thời điểm xuất hiện bệnh và tỷ lệ chết tích lũy cũng khác nhau (Hình 6).



Hình 6: Tỷ lệ chết tích lũy (%) sau 14 ngày cảm nhiễm của 2 chủng *A. schubertii* SCL30 (A) và STC56 (B)

Kết quả ghi nhận được sau khi theo dõi 14 ngày, ở các nghiệm thức đều có cá chết ngoại trừ nghiệm thức tiêm nước muối sinh lý. Cụ thể, ngày thứ 1 không ghi nhận được cá chết ở tất cả nghiệm thức,

tuy nhiên cá bắt đầu có biểu hiện bơi lờ đờ, bỏ ăn, phản ứng chậm với tiếng động.

Chủng *A. schubertii* SCL30 cá bắt đầu chết vào ngày thứ 2 ở tất cả nghiệm thức, các ngày sau đó ghi

nhận được tỉ lệ chết tăng dần đều ở tất cả các nghiệm thức và cá ngừng chết vào ngày thứ 10 sau cảm nhiễm.

Chủng STC56, ngày thứ 2 cá bắt đầu chết ở nồng độ tiêm 10^5 , ngày thứ 5 cá bắt đầu chết ở nghiệm thức 10^4 , 10^3 , 10^2 và tỉ lệ chết tăng mạnh vào ngày thứ 6, đến ngày thứ 8 cá không còn chết ở cả bốn nghiệm thức.

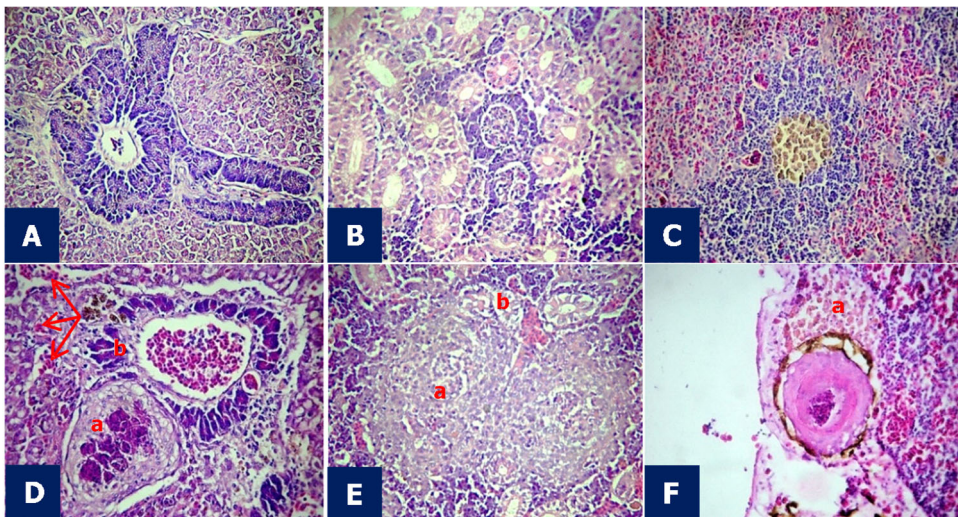
Ghi nhận sau 14 ngày theo dõi, hai chủng *A. schubertii* SCL30 và STC56 có tỉ lệ chết ở nghiệm thức 10^3 (cận trên) lần lượt là 46,67% và 35%, ở nghiệm thức 10^4 (cận dưới) là 57,14% và 60%. Từ kết quả thí nghiệm cảm nhiễm xác định được giá trị LD_{50} sau 144 giờ của chủng vi khuẩn *A. schubertii* SCL30 và STC56 là $6,59 \times 10^3$ CFU/mL và $8,12 \times 10^3$ CFU/mL. Theo nghiên cứu của Chen *et al.* (2012) xác định LD_{50} của 3 chủng *A. schubertii* trên cá lóc *Channa maculata* lần lượt là $1,4 \times 10^4$; $4,5 \times 10^4$; $6,4 \times 10^6$ CFU/mL. Như vậy, giá trị LD_{50} của chủng vi khuẩn trong nghiên cứu này cao hơn so với nghiên cứu trước đó. Có thể do sự khác biệt ở các đoạn gen độc lực nên chủng *A. schubertii* SCL30 gây chết sớm hơn chủng *A. schubertii* STC56 nhưng lại có giá trị độc lực thấp hơn, tuy nhiên cả hai chủng đều có thời gian gây chết kéo dài từ 8-10 ngày.

Dấu hiệu bệnh lý cá lóc sau cảm nhiễm quan sát được trong thí nghiệm này tương tự với dấu hiệu bệnh lý cá lóc bệnh “đốm trắng nội tạng” trong ao nuôi cá lóc thâm canh tại tỉnh Trà Vinh. Cá bắt đầu chết với các dấu hiệu bên ngoài như xuất hiện nhiều đốm đỏ trên thân, vùng bụng, xuất huyết ở các góc

vây, da bị nhạt màu. Vào các ngày đầu, dấu hiệu bệnh lý bên trong chỉ quan sát thấy thận và tỳ tạng sưng sạm. Sau 3 ngày cảm nhiễm, biểu hiện đốm trắng mới xuất hiện rõ trên gan, thận và tỳ tạng. Ngoài ra, quan sát bên trong còn thấy một số dấu hiệu bệnh lý đi kèm như xoang bụng có dịch, xuất huyết, gan, thận, tỳ tạng sưng to, sạm đen. Các dấu hiệu bệnh lý càng biểu hiện rõ về giai đoạn sau của thí nghiệm cảm nhiễm và kết quả tái phân lập được vi khuẩn hình que ngắn, Gram âm, có các chi tiêu sinh hóa tương tự như chủng vi khuẩn gây cảm nhiễm nên kết quả thí nghiệm đã thỏa mãn định đề Koch. Vì vậy, *Aeromonas schubertii* chính là tác nhân gây bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc (*Channa striata*).

3.4 Mô bệnh học cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng

Các tổn thương dạng u hạt được quan sát thấy ở gan, thận, tỳ tạng của cá bệnh nhưng tập trung chủ yếu là ở thận và tỳ tạng, kết quả này tương tự như trên cá chêm (Gauthier *et al.*, 2003), cá hồi (Ferguson, 2006), cá chim vây vàng (Nguyễn Thị Thùy Giang và *ctv.*, 2013), cá lóc (Nguyễn Thị Ngọc Huyền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016), nhưng có sự khác biệt so với kết quả của Chen *et al.* (2012), khi quan sát mô cá lóc cảm nhiễm vi khuẩn *A. Schubertii* không có sự xuất hiện của các dạng u hạt và dấu hiệu bệnh lý bên trong cũng không thấy sự hiện diện của các đốm trắng trên nội quan. Sự sai khác này có thể do khác biệt về loài cá, điều kiện khí hậu và thời gian gây bệnh của vi khuẩn.



Hình 7: Cấu trúc mô bệnh học cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng

(A), (B), (C): Cấu trúc mô gan, thận, tỳ tạng của cá lóc khỏe. (D): U hạt (a) nằm cạnh đảo tụy (b) và mô gan bị xuất huyết (mũi tên). (E): U hạt trên mô thận (a) làm mất cấu trúc ống thận (b). (F): U hạt nằm cạnh trung tâm đại thực bào sắc tố ở tỳ tạng (a)

Các u hạt được quan sát qua phương pháp mô học nhìn chung có sự khác nhau về hình dạng và kích thước, có thể do sự khác nhau của cấu trúc mô gan, thận và tỷ tạng hoặc do bệnh lý diễn biến kéo dài u hạt có nhiều giai đoạn phát triển. Tuy nhiên, các khối u này đều có chung điểm tương đồng như vùng hoại tử nằm ở phần lõi và được bao quanh bởi một lớp vách dày, các dạng tổn thương hay viêm u hạt đều có các đặc điểm gần tương tự nhau chính là sự kết tập lại của các tế bào miễn dịch (lympha, các dạng bạch cầu hạt và đại thực bào) bao quanh ngăn cản sự lan tỏa của tác nhân gây bệnh (Gauthier *et al.*, 2003). Sự kết tập này tạo thành một lớp vỏ dày có thể quan sát bằng mắt thường là các nốt mù trắng bên trong gan, thận, tỷ tạng.

Các u hạt xuất hiện trên gan làm phá vỡ cấu trúc của đảo tụy, xung huyết và xuất huyết bên trong gan (Hình 7). Trên thận và tỷ tạng cũng ghi nhận được các dấu hiệu tương tự như ở gan, nhưng có sự tăng sinh của các trung tâm đại thực bào sắc tố. Sự xuất hiện của các trung tâm đại thực bào sắc tố là cơ chế miễn dịch đặc thù của cá khi có tác nhân nhiễm khuẩn nội sinh (Ferguson, 2006). Do một trong những chức năng chính của các trung tâm đại thực bào sắc tố là tấn công các tác nhân ngoại sinh và phá hủy đồng thời chứa đựng các mảnh vụn của các tế bào bị tổn thương hoặc hư hỏng, bao gồm các tế bào hồng cầu (Agius and Roberts, 2003).

4 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu đã xác định các chủng vi khuẩn phân lập trên cá lóc (*Channa striata*) bệnh đốm trắng nội tạng là vi khuẩn *Aeromonas schubertii*. Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm xác định các chủng vi khuẩn phân lập có khả năng gây bệnh trên cá lóc khỏe trong điều kiện cảm nhiễm thực nghiệm giống như dấu hiệu bệnh ở ao nuôi. Giá trị LD₅₀ của hai chủng *A. schubertii* SCL30, STC56 lần lượt là $6,59 \times 10^3$ và $8,12 \times 10^3$ CFU/mL. Kết quả mô bệnh học trên ba cơ quan gan, thận, tỷ tạng cá lóc bệnh đốm trắng nội tạng quan sát được các u hạt vách dày, có lõi tương ứng với các mù trắng quan sát được trên cá nhiễm bệnh.

5 ĐỀ XUẤT

Xác định một số loại gen độc lực của vi khuẩn *Aeromonas schubertii* để hiểu rõ cơ chế gây bệnh của vi khuẩn lên cá lóc (*Channa striata*). Nghiên cứu chuyên sâu các giai đoạn phát triển bệnh học của bệnh đốm trắng nội tạng trên cá lóc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Agius, C. and Roberts, R. J., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases*. 26(9): 499-509.

Buller, B. N., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. AMA DataSet. UK, 390 pages.

Cao, H., Hou, S., He, S., Lu, L. and Yang, X., 2013. Identification of a Bacteriovorax sp. isolate as a potential biocontrol bacterium against snakehead fish-pathogenic *Aeromonas veronii*. *Journal of Fish Diseases*. 37(3): 283-290.

Carnahan, A. M., Chakraborty, T., Fanning, G. R., Verma, D., Ali, A., Janda, J. M. and Joseph, S. W., 1991. *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 29(6): 1206-1210.

Carnahan, A. M., Marii, M. A., Fanning, G. R., Pass, M. A. and Joseph, S. W., 1989. Characterization of *Aeromonas schubertii* strains recently isolated from traumatic wound infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 27(8): 1826-1830.

Carol, A., Martinez-Murcia, A. J. and Collins, M. D., 1993. Identification of *Aeromonas schubertii* and *Aeromonas jandaei* by using a polymerase chain reaction-probe test. *FEMS Microbiology Letters*. 108(2): 151-156.

Chen, Y. F., Liang, R. S., Zhuo, X. L., Wu, X. T. and Zou, J. X., 2012. Isolation and characterization of *Aeromonas schubertii* from diseased snakehead, *Channa maculata* (Lacepede). *Journal of Fish Diseases*. 35(5): 421-430.

Duret, L. and Bucher, P., 1997. Searching for regulatory elements in human non-coding sequences. *Current Opinion in Structural Biology*. 7(3): 399-406.

Ferguson, H. W., 2006. *Systemic Pathology of Fish: a text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease*, Second edition. London. 367 pages.

Frerichs, N. G. and Millar, S. D., 1993. *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogens*. Pisces Press. U.K. 55pages.

Gauthier, D. T., Rhodes, M. W., Vogelbein, W. K., Kator, H. and Ottinger, C. A., 2003. Experimental Mycobacteriosis in striped bass *Morone saxatilis*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 54(2): 105-117.

Hickman-Brenner, F. W., Fanning, G. R., Arduino, M. J., Brenner, D. J. and Farmer, J. J., 1988. *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(8): 1561-1564.

Liu, J. Y. and Li, A. H., 2012. First case of *Aeromonas schubertii* infection in the freshwater cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor), in China. *Journal of Fish Diseases*. 35(5): 335-342.

Maurilio, L. F., Gabriel, A. G., Sara, B. B. Z., Karina, Y. S. S and Ana, A. Z., 2014. Identification of *Mycobacterium* agent isolated from tissues of Nile tilapia (*Oreochromis*

- niloticus). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 14(1-2): 575-580.
- Nguyễn Thị Ngọc Huyền và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2016. Đặc điểm mô bệnh học của cá lóc (*Channa striata*) bệnh xuất huyết và bệnh gan thận mù. Tạp chí Khoa học Trường đại học Cần Thơ. 42B(2016): 93-100.
- Nguyễn Thị Thùy Giang, Dương Văn Quý Bình và Đỗ Thị Hòa, 2013. Nghiên cứu bước đầu về bệnh đốm trắng nội tạng ở cá chim vây vàng (*Trachinotus blochii*) nuôi ở Nha Trang. Đại học Nha Trang. Hội nghị khoa học trẻ ngành thủy sản toàn quốc. 427-437.
- Rajendirane, A., Natarajan, E. and Subramanian, P., 2008. Control of *Aeromonas hydrophila* infection in spotted snakehead, *Channa punctatus*, by *Solanum nigrum* L., a Medicinal Plant. Journal of the world aquaculture society. 39(3): 375-383.
- Reed, J. L and Muench, H. A., 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. The American journal of Hygiene. 27(3): 493-497.
- Sinh, L. X., Navy, H., and Pomeroy, R. S., 2014. Value chain of snakehead fish in the lower Mekong Basin of Cambodia and Vietnam. Aquaculture Economics & Management. 18(1): 76-96.
- Tagle, D. A., Koop, B. F., Goodman, M., Slightom, J. L., Hess, D. L. and Jones R. T., 1988. Embryonic epsilon and gamma globin gens of a prosimian primate (*Galago crassicaudatus*). Nucleotide and amino acid sequences, developmental regulation and phylogenetic footprints. Journal of Molecular Biology. 203(2): 439-455.
- Talpur, A. D., Munir, M. B., Mary, A. and Hashim, R., 2014. Dietary probiotics and prebiotics improved food acceptability, growth performance, haematology and immunological parameters and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* in snakehead (*Channa striata*) fingerlings. Aquaculture. 426-427: 14-20.
- Thompson, J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. and Higgins D. G., 1997. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research. 25(24): 4876-4882.
- Dung, T. T., Ngoc, N. T. N., Thinh, N. Q., Thy, D. T. M., Tuan, N. A., Shinn, A. and Crumlish, M., 2008. Common diseases of *Pangasius* Catfish farmed in Vietnam. Global Aquaculture Advocate, 11: 76-77.
- Zheng, W., Cao, H. and Yang, X., 2012. *Aeromonas veronii* infection in the cultured snakehead fish, *Ophiocephalus argus* (Cantor). 6(44): 7218-7223.