

# PHÂN LẬP VÀ ĐỊNH DANH VI KHUẨN *Aeromonas hydrophila* TRÊN ẾCH THÁI LAN "*Rana tigerina*" NUÔI TẠI KHU VỰC VEN ĐÔ THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

CHARACTERIZATION OF BACTERIA ISOLATED FROM FARMED FROG (*Rana tigerina*)  
IN PERI – URBAN OF HCM CITY

Trần Hồng Thủy

Bộ môn Sinh học và Quản lý Nguồn lợi Thủy sản, Khoa Thủy sản

Trường Đại học Nông Lâm Tp. HCM

## ABSTRACT

This study was conducted from September 2006 to September 2007 to identify major pathogens, especially bacteria, of diseased frog (*Rana tigerina*) farmed in the peri –urban area of Ho Chi Minh City. Challenge of cultured frog with *Aeromonas hydrophila*. That were isolated from diseased frogs with clinical signs of ulcerative syndrome were carried out. Experimental frogs were injected on the ventral left thigh with a variety of bacterial concentrations. Average 18-25g sized frog (*Rana tigerina*) were stocked at 10 frogs/tank. There were four treatments with triplicate each: control (injected with 0.85% sterile NaCl),  $9 \times 10^6$  cfu/ml,  $9 \times 10^7$  cfu/ml, and  $9 \times 10^8$  cfu/ml for bacterial infection challenges. The mortalities occurred at bacterial concentration of  $9 \times 10^6$  cfu/ml,  $9 \times 10^7$  cfu/ml, and  $9 \times 10^8$  cfu/ml were 57%, 90% and 100%, respectively. No bacteria were isolated from frogs in the control at the end of experiment.

Signs of moribund frogs included light-reddish fluid in the body cavity and haemorrhage on the skin of abdomen and thigh. *Aeromonas hydrophila* were isolated frog diseased frog in bacterial injection challenge treatments. Those results point out the importance of *Aeromonas hydrophila* as causal agents of ulcerative syndrome in frog.

## GIỚI THIỆU

Thành Phố Hồ Chí Minh những năm gần đây rộ lên phong trào nuôi ếch với nhiều hình thức nuôi khác nhau. Nguồn ếch giống được nhập về từ Thái Lan. Ếch Thái Lan *Rana tigerina* vòng đời ngắn, tăng trưởng nhanh và thích hợp với điều kiện nuôi tại khu vực ven đô Thành phố Hồ Chí Minh. Tuy nhiên, song song với sự phát triển nuôi ếch công nghiệp đó là sự gia tăng đáng kể tình hình dịch bệnh làm ếch chết hàng loạt mà không rõ nguyên nhân. Ếch bệnh có những biểu hiện lâm sàng như mệt mỏi bỏ ăn, xuất hiện những vết lở loét trên da và tổn thương ở chân sau, bụng xuất huyết, chân bại liệt, queo cổ, mù mắt, sưng bụng. tỷ lệ chết lên tới 80-90%. Do thiếu kinh nghiệm trong kỹ thuật nuôi nên dịch bệnh thường xuyên xảy ra, gây thiệt hại

lớn về kinh tế cho người dân. Phong trào nuôi ếch có phần chững lại. Theo báo cáo của Viện Nghiên cứu Sức Khỏe Động Vật Thủy Sản- Thái Lan (AAHRI) năm 1997, 120 loài vi khuẩn phân lập được từ ếch bình thường và ếch bệnh ở các trại thuộc 8 tỉnh của Thái Lan. Những vi khuẩn xác định được chủ yếu là vi khuẩn Gram âm như: *Aeromonas hydrophila*, *A.sobria*, *Pseudomonas*... Một số nghiên cứu khác của Somsiri và ctv,1997, cũng tìm thấy *A.hydrophila* trên ếch bị bệnh lở loét ở Thái Lan trong quá trình phân lập và định danh. Dựa trên những kết quả đã nghiên cứu tại Thái Lan, đồng thời xuất phát từ tình hình thực tế về dịch bệnh trong nước, việc tìm ra nguyên nhân và biện pháp phòng trị bệnh hữu hiệu là yêu cầu cần thiết. Chúng tôi tiến hành “Phân lập và định danh vi khuẩn *A.hydrophila* trên ếch Thái Lan *Rana tigerina* nuôi tại khu vực ven đô TP.Hồ Chí Minh”.

Mục đích của nghiên cứu này là phân lập và định danh được vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* trên ếch nuôi bị bệnh đồng thời tiến hành gây cảm nhiễm ngược vi khuẩn *A.hydrophila* trên ếch nuôi khỏe mạnh để xác định xem *A.hydrophila* có đúng là vi khuẩn gây bệnh lở loét và đỏ chân trên ếch Thái Lan nuôi tại Khu vực ven đô TP.Hồ Chí Minh hay không? Từ đó có hướng nghiên cứu tiếp theo về vấn đề phòng và trị bệnh cho ếch, góp phần duy trì và phát triển nuôi ếch công nghiệp tại khu vực Thành phố Hồ Chí Minh trong thời gian tới.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Nội dung

Phân lập và định danh vi khuẩn *A.hydrophila* trên mẫu ếch bệnh thu tại khu vực Quận 9, Q. Thủ Đức, huyện Củ Chi, Hóc Môn.

Gây cảm nhiễm ngược vi khuẩn *A.hydrophila* trên ếch giống khỏe mạnh.

### Phương pháp

Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn từ ếch nuôi bị bệnh theo phương pháp truyền thống của Bergey

- Thu mẫu ếch bệnh từ một số trại nuôi tại khu vực nghiên cứu. Thu mẫu vào các thời điểm xảy ra dịch bệnh và thu mẫu định kỳ mỗi tháng một lần, từ tháng 9/2006 đến tháng 9/2007.

- Tiến hành giải phẫu ếch bệnh thu mẫu máu, gan, lách, thận. tụy nuôi cấy trên môi trường NA (Nutrien Agar). Ủ ở 37°C trong thời gian từ 18-24 giờ. Chọn khuẩn lạc riêng lẻ phân lập, cấy truyền, làm thuần tăng sinh sau đó nhuộm gram, thử các phản ứng sinh hóa, định danh bằng bộ kit API-20E (BioMerieux, Pháp). Sau khi phân lập được vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* chúng tôi tiến hành gây cảm nhiễm lên ếch giống khỏe mạnh. Nếu vi khuẩn thu được từ ếch bị bệnh nhân tạo (với dấu hiệu bệnh lý tương tự) là vi khuẩn phân lập được từ mẫu ếch bệnh ngoài hiện trường thì kết luận vi khuẩn đó chính là tác nhân gây bệnh.

*Phương pháp gây bệnh thực nghiệm*

Chúng tôi tiến hành gây cảm nhiễm ngược vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập được từ ếch bệnh

ngoài hiện trường lên ếch giống khỏe mạnh có trọng lượng từ 18-25g/con. trong thời gian 14 ngày.

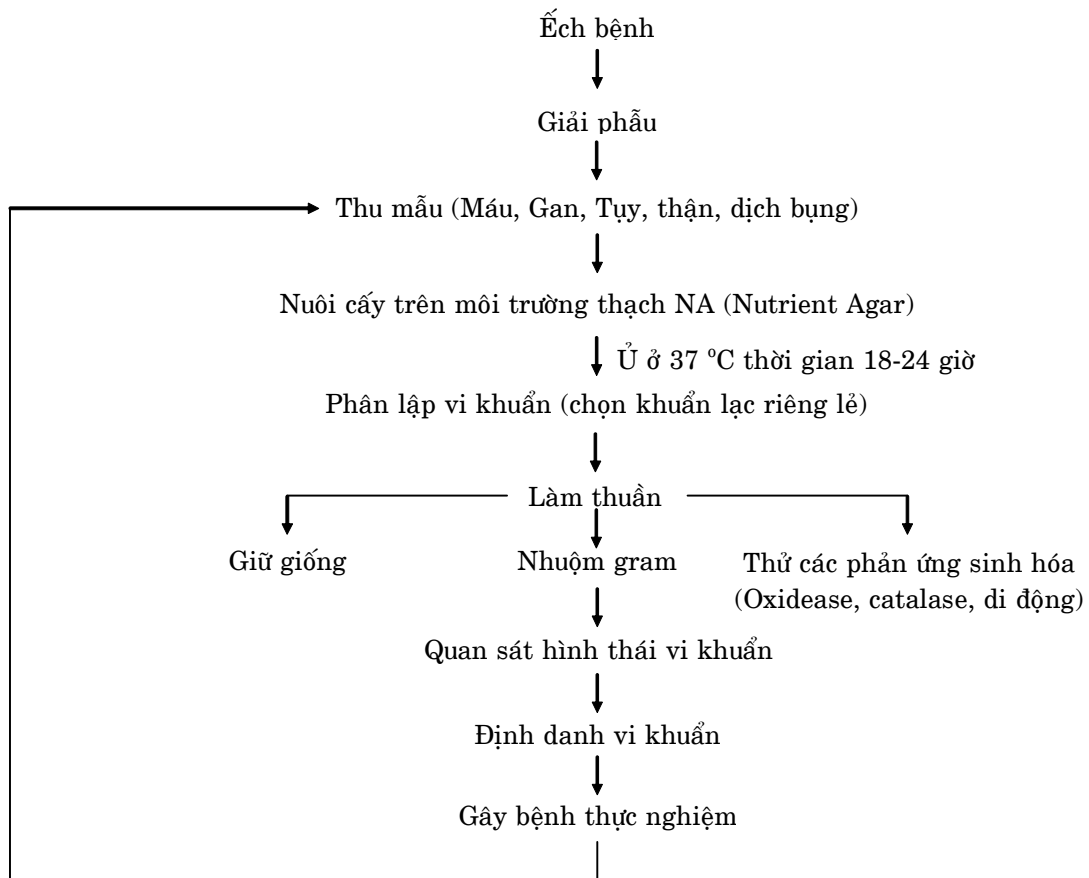
Thí nghiệm gồm: nghiệm thức đối chứng, nghiệm thức có mật độ vi khuẩn  $9 \times 10^6$ cfu/ml,  $9 \times 10^7$ cfu/ml và  $9 \times 10^8$ cfu/ml. mỗi nghiệm thức được lập lại 3 lần.

Mật độ Ếch thí nghiệm 10con/bể (kích thước bể 30cm x 40cm x 35cm).

Liều gây bệnh: Tiêm vào cơ đùi mỗi ếch 0,1ml huyền dịch vi khuẩn. Lô đối chứng mỗi ếch được tiêm 0,1 ml nước muối sinh lý.

Trong quá trình bố trí thí nghiệm ếch ở tất cả các lô thí nghiệm được chăm sóc như nhau. Theo dõi các biểu hiện bất thường của ếch, thu mẫu ếch chết hoặc có biểu hiện bệnh, yếu. Tiến hành mổ, phân lập định danh những ếch bệnh và những ếch còn sống sót sau thời gian kết thúc thí nghiệm.

**Sơ đồ khái quát quá trình thực hiện**



**KẾT QUẢ THẢO LUẬN**

**Kết quả phân lập vi khuẩn từ ếch bệnh thu ngoài hiện trường**

Sau khi thu mẫu ếch bệnh từ các trại thuộc khu vực nghiên cứu, chúng tôi tiến hành phân lập 145 mẫu vi khuẩn từ các cơ quan như: Máu tim, Gan, Lách, tụy, Thận, dịch bụng. Kết quả định danh như sau: 45 mẫu *A. hydrophila*, 68 mẫu (bao gồm 14 giống vi khuẩn) như: *Chryseobacterium indologenes*, *Salmonella choleraesuis ssp/arizonal*, *Vibrio*, *Pasteurella pneumotropica*, *Pseudomonas flurescens/putida*, *Enterobacteria*, *Citrobacter freundii* ....32 mẫu chưa định danh được.(Biểu đồ 1).

Từ kết quả định danh vi khuẩn thu được trên ếch bệnh ngoài hiện trường, kết hợp với các kết quả nghiên cứu trước đây của Viện Nghiên Cứu Sức Khỏe Động Vật Thủy Sản-Thái Lan (AAHRI) năm 1997; Somsiri và ctv,1996. Chúng tôi chọn

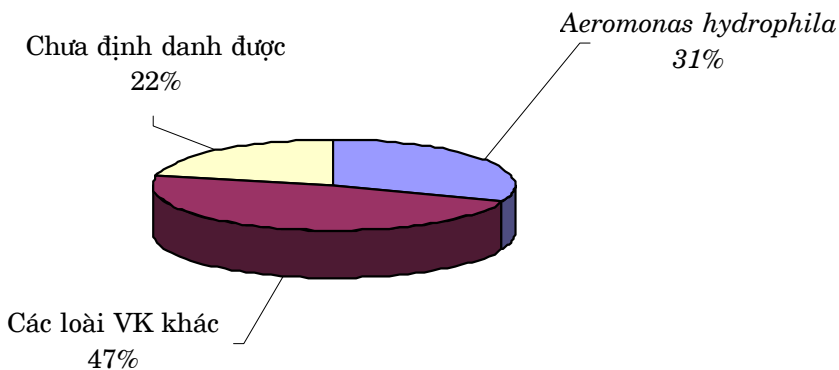
*A. hydrophila* tiến hành gây cảm nhiễm ngược lên ếch khỏe mạnh.

**Kết quả gây cảm nhiễm ngược**

Sau khi tiến hành gây bệnh thực nghiệm vi khuẩn *A. hydrophila* trên ếch giống khỏe mạnh có trọng lượng từ 18-25g, trong thời gian 14 ngày. Kết quả cho thấy:

Sau 8 giờ kể từ khi bắt đầu tiêm vi khuẩn, ở nghiệm thức có mật độ vi khuẩn là  $9 \times 10^8$ cfu/ml: ếch có biểu hiện mệt mỏi bất động không ăn và bắt đầu có ếch bị chết

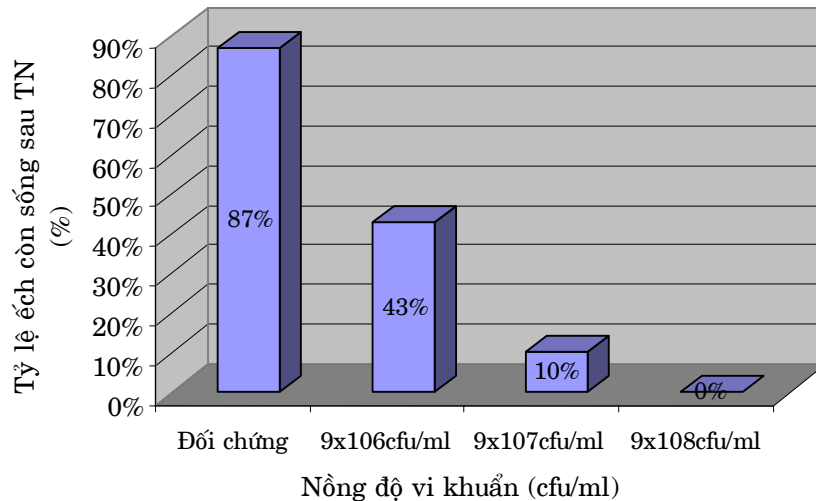
Sau 10 giờ kể từ khi bắt đầu tiêm vi khuẩn, ếch ở nghiệm thức có mật độ vi khuẩn  $9 \times 10^7$ cfu/ml cũng bắt đầu chết rải rác và sau 12 giờ thì ếch ở nghiệm thức có mật độ vi khuẩn  $9 \times 10^6$ cfu/ml bắt đầu chết. Ếch chết cơ thể bị tích nước, xuất huyết dưới da, tuột nhớt, tại vết tiêm ở đuôi sau cơ bị hoại tử.



**Biểu đồ 1.** Tỷ lệ % vi khuẩn định danh được từ ếch bệnh ngoài hiện trường



Hình 1. Ếch bị bệnh sau khi tiêm vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*



Biểu đồ 3. Tỷ lệ sống của ếch Sau thời gian gây cảm nhiễm ngược

Chúng tôi tiến hành mổ, phân lập, định danh 85 mẫu vi khuẩn tại một số cơ quan như: Dịch ứ trong khoang bụng, gan, lách, thận, cơ và máu tim. Kết quả ghi nhận được như sau: 52 mẫu là *A. hydrophila* chiếm 61,17%, 21 mẫu là các vi khuẩn khác (*Serratia liquefaciens*, *Chyseeomonas luteola*, *Enterobacter*, *Salmonella arizonae*, *Escherichia coli* *Pasteurella*...). (Biểu đồ 2).

Tiếp tục theo dõi thí nghiệm, sau 2 ngày Ếch ở nghiệm thức tiêm nồng độ vi khuẩn 9x10<sup>8</sup> cfu/ml chết 100%. Sau 5 ngày tất cả những ếch còn sống quan sát thấy tại vết tiêm có hiện tượng lở loét, hoại tử. Một số ếch có hiện tượng lở loét trên da và tứ chi. Mổ quan sát nội tạng ếch chết, yếu thấy gan, lách, thận có hiện tượng mũ trắng. Tuy nhiên 10 ngày sau khi tiêm, những ếch còn sống sót tại vết tiêm có hiện tượng khép miệng, và kết thúc thí nghiệm những ếch còn sống vết thương đã lành, ếch ăn bình thường.

Sau 14 ngày theo dõi thí nghiệm, chúng tôi ghi nhận kết quả: sau 24 giờ ếch ở nghiệm thức có nồng độ vi khuẩn 9x10<sup>8</sup>cfu/ml ếch chết 100%. ở nghiệm thức có nồng độ vi khuẩn 9x10<sup>7</sup>cfu/ml sau 14 ngày ếch chết 90%. Ở nghiệm thức có nồng độ vi khuẩn 9x10<sup>6</sup>cfu/ml ếch chết 57%. Nghiệm thức đối chứng 13%.

Biểu đồ 3 cho thấy tỷ lệ ếch còn sống sót sau thời gian bố trí thí nghiệm. Chúng tôi tiến hành mổ tất cả những ếch còn sống sau 14 ngày, phân lập, định danh kết quả cho thấy:

Nghiệm thức đối chứng mổ 26 ếch (87%), không có sự hiện diện của vi khuẩn *A. hydrophila*.

Nghiệm thức có nồng độ vi khuẩn 9x10<sup>6</sup>cfu/ml số ếch sống sót 13 ếch (43%) quan sát ngoài thấy bình thường. Mổ quan sát nội tạng tất cả các ếch gan, lách, thận đều bị mũ. Tuy nhiên, không làm ếch chết.



**Hình 2.** Hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập từ ếch bệnh



**Hình 3.** *A. hydrophila* gây hoại tử cơ đuôi ếch

Nghiệm thức có nồng độ vi khuẩn  $9 \times 10^7$  cfu/ml số ếch sống sót 03 ếch (10%). Quan sát bên ngoài một số ếch vết thương đã khép miệng nhưng chưa hoàn toàn lành (hình 3), mổ nội tạng các cơ quan đều bị mủ. Vi khuẩn định danh vẫn có sự hiện diện của *A. hydrophila* nhưng ít hơn kết quả định danh ban đầu.

Từ kết quả ghi nhận được sau thời gian thí nghiệm, chúng tôi đưa ra kết luận *A. hydrophila* chính là một trong số những vi khuẩn gây bệnh lở loét trên ếch nuôi tại khu vực ven đô thành phố Hồ Chí Minh. Kết quả này cũng giống với kết quả nghiên cứu của Somsiri và ctv (1997), khi gây cảm nhiễm ngược trên ếch Thái Lan với *A. hydrophila* và *A. sobria* thì triệu chứng lâm sàng trên ếch phù hợp với biểu hiện ban đầu khi phân lập 2 loài vi khuẩn này. Gibbs, (1973) cũng cho rằng *A. hydrophila* được xem là nguyên nhân gây nên triệu chứng lở loét và tỷ lệ chết cao đối với ếch trong điều kiện phòng thí nghiệm.

## KẾT LUẬN

*A. hydrophila* là vi khuẩn chiếm ưu thế trong quá trình phân lập được từ ếch bệnh lở loét ngoài hiện trường.

Sau khi gây bệnh thực nghiệm, vi khuẩn thu được từ ếch bị bệnh thực nghiệm cũng chính là vi khuẩn khi tiêm vào ếch khỏe. Ếch có các biểu hiện tương tự ếch bệnh ngoài hiện trường.

*A. hydrophila* chính là một trong số vi khuẩn gây bệnh lở loét trên ếch Thái Lan nuôi tại khu vực ven đô Thành phố Hồ Chí Minh.

Kết quả thu được tương tự kết quả nghiên cứu bệnh trên ếch Thái Lan của Somsiri và ctv năm 1997 ở Thái Lan.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Temdoung Somsiri., Supranee Chinabut and Suriyan Soontornvit, 1996. Challenge of cultured frogs (*Rana tigerina*) with *Aeromonas spp.* In *Proceedings of World Aquaculture, 1996. The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society.*
- Kanchanakhan. S., 1998. *An ulcerative disease of the cultured Tiger Frog, Rana tigerina, in Thailand: Virological Examination.* AAHRI Newsletter Article Vol. 7(2).
- Temdoung Somsiri. Diseases of cultured frogs in Thailand. *Aquatic Animal Health Research Institute Department of Fisheries Jatujak Bangkok 10900.*
- Kantimane Panwichien and Supranee Chinabut, 1997. Somsiri T., S. Chinabut, and S. Soontornvit, 1997. *Challenge of cultured frogs (Rana tigerina) with Aeromonas Species.* In: T.W Flegel and I.H. MacRae (eds.), *Diseases in Asian Aquaculture III.* Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Viện nghiên cứu nuôi trồng Thủy Sản II, 1992. *Bài giảng về bệnh cá tôm.* Bộ Thủy Sản.
- Viện nghiên cứu nuôi trồng Thủy Sản II, 1992. *Các bài thực hành nghiên cứu và chuẩn đoán bệnh Cá-Tôm.* Bộ Thủy Sản.
- Lê Thanh Hùng, 2000. *Kỹ thuật nuôi công nghiệp ếch Thái Lan (Rana rugulosa).* Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.