

BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU BỆNH DO VI KHUẨN *Flavobacterium columnare* TRÊN CÁ RÔ PHI (*Oreochromis* sp.) NUÔI TẠI THỪA THIÊN - HUẾ

Nguyễn Ngọc Phước¹, Nguyễn Thị Huệ Linh¹, Nguyễn Thị Xuân Hồng¹

TÓM TẮT

Flavobacterium columnare một trong những tác nhân chính gây bệnh nguy hiểm trên cá rô phi (*Oreochromis* sp.) nuôi trên thế giới. Trong nghiên cứu này đã phân lập được 11 chủng *F. columnare* trên cá rô phi bị bệnh nuôi tại 7 hộ ở 02 thị xã là Hương Trà và Hương Thủy, tỉnh Thừa Thiên - Huế. Cá rô phi bị bệnh có các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng như mang bị thương tổn hoặc chuyển sang màu vàng nhạt. Kết quả định danh bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu FcFd và FcRs cho thấy tất cả 11 chủng này đều là vi khuẩn *F. columnare*, các chủng vi khuẩn này có hình sợi mảnh, gram âm, di động theo dạng trượt, phản ứng với congo red và flexiburin. Các chủng vi khuẩn phân lập được khá đồng nhất về đặc điểm sinh hóa. Liều gây chết 50% đối với cá rô phi thí nghiệm của các chủng vi khuẩn phân lập được là $6 \times 10^3 - 10^6$ cfu/mL. Các chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập được trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên - Huế nhạy cảm với các loại kháng sinh tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazol và kháng với ampicillin, amoxicillin.

Từ khóa: Cá rô phi, *Oreochromis* sp., *Flavobacterium columnare*, Thừa Thiên - Huế.

1. MỞ ĐẦU

Vi khuẩn *Flavobacterium columnare* thuộc nhóm vi khuẩn gram âm, có dạng hình sợi, có khả năng di động theo dạng trượt và là một trong những tác nhân gây bệnh nguy hiểm ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của nhiều loài cá nuôi nước ngọt trên thế giới [1]. Vi khuẩn thường bám trên mang, vây và phần đầu của cá và gây nên những tổn thương như tạo các đốm trắng, gây hoại tử viêm loét tại vị trí ký sinh và làm mang chuyển sang màu vàng hoặc trắng xám [8, 16, 23]. Tuy nhiên, vi khuẩn này không gây ra hiện tượng cảm nhiễm hệ thống và không phân lập được từ nội quan của cá nuôi bị bệnh [21]. Vi khuẩn *F. columnare* thường được phân lập từ các vết thương tổn ở da, mang, vây cá và vi khuẩn chỉ có thể phát triển trên môi trường nghèo dinh dưỡng như môi trường Cytophaga [13]; môi trường Shieh [19] hay môi trường peptone, yeast extract, salt (PYES) [22] từ 2-4 ngày ở nhiệt độ từ 25-30°C. Dịch bệnh do *F. columnaris* gây ra thường bùng phát vào mùa hè khi nhiệt độ nước cao [10]. Tuy nhiên việc phân lập *F. columnare* từ mẫu bệnh phẩm gặp nhiều khó khăn do thời gian nuôi cấy dài (từ 2-4 ngày) nên các loại vi khuẩn khác sẽ phát triển và ức chế sự phát triển của *F.*

columnare, vì thế việc bổ sung kháng sinh như polymyxin B (10 U/mL) và neomycin (5 µg/mL) [11] hay 1 µg/mL tobramycin [6] trong môi trường nuôi cấy là cần thiết để nâng cao khả năng phân lập *F. columnare* do *F. columnare* có thể kháng các loại kháng sinh này. Cá rô phi (*Oreochromis* sp.) hay còn gọi là cá điêu hồng thuộc họ Cichlida, bộ Perciformes là đối tượng được nuôi ở rất nhiều nước trên thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Hiện nay, cá rô phi cũng là đối tượng nuôi chính tại Thừa Thiên - Huế, mang lại nguồn thu nhập ổn định cho người dân. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, dịch bệnh trên cá rô phi thường xảy ra vào mùa hè với những dấu hiệu bệnh lý điển hình giống với bệnh lý do vi khuẩn *F. columnare* gây ra là mang bị hoại tử, dính kết lại và chuyển sang màu vàng nhạt, gây tỷ lệ tử vong cao. Tuy nhiên, chưa có báo cáo về tình hình dịch bệnh do vi khuẩn *F. columnare* gây trên cá rô phi tại Việt Nam nói chung và Thừa Thiên - Huế nói riêng. Vì thế, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định tác nhân gây bệnh trên mang và nguyên nhân gây tỷ lệ chết cao ở cá rô phi nuôi. Đồng thời, nghiên cứu đặc điểm sinh hoá, khả năng miễn dịch với kháng sinh của các chủng vi khuẩn phân lập được và xác định liều gây chết LD₅₀ của chúng vi khuẩn gây bệnh sẽ được tiến hành nhằm cung cấp cơ sở khoa học cho các nghiên cứu sâu hơn về tác

¹ Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế
Email: nguyenngocphuc@hual.edu.vn

nhân gây bệnh này và làm tiền đề để đề xuất các phương pháp phòng và trị bệnh.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm thu mẫu

Mẫu cá bệnh được thu trực tiếp tại 7 hồ nuôi cá rô phi (*Oreochromis* sp.) lồng, trong đó mẫu được thu tại 3 hồ ở phường Tứ Hạ (thị xã Hương Trà), tại 02 hồ ở xã Bình Điền (thị xã Hương Trà) và tại 02 hồ ở phường Phú Bài (thị xã Hương Thủy) từ tháng 4 cho đến tháng 8 năm 2018. Tại mỗi hồ tiến hành thu 3-5 con cá có dấu hiệu bệnh lý điển hình như có một số vảy trên mang chuyển sang màu vàng nhạt, cá thở gấp, nổi đầu. Những mẫu cá bệnh này được quan sát các dấu hiệu bệnh lý bên ngoài và dấu hiệu bệnh tích bên trong cơ thể.

2.2. Phương pháp phân lập vi khuẩn

Tiến hành thu mẫu chọn lọc: thu mẫu cá có các biểu hiện như hôn mê, vận động khó khăn không định hướng, bơi gần mặt nước, bơi vòng tròn hoặc dớp không khí, mang bị thương tổn thương.

Thu mẫu vi khuẩn được tiến hành tại hiện trường bằng cách dùng dao mổ đã được tiệt trùng bằng cồn 90°C, cắt xương nắp mang, dùng tăm bông tiệt trùng chà lên vùng hoại tử trên mang sau đó cấy lên môi trường PYES agar (HiMedia, Ấn Độ) có bổ sung 1 µg/mL tobramycin [6] đã được chuẩn bị sẵn. Dùng parafin bao kín lại và ủ ở nhiệt độ 28°C trong 48-72 giờ.

2.3. Phương pháp định danh vi khuẩn bằng PCR

Sử dụng cặp mồi đặc hiệu FcFd (TGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAGAGAGA) và FcRs (TAATYRCTAAAGATGTTCTTTCTAC TTGTTTG) để định danh vi khuẩn *F. columnare* với Y = pyrimidine (C or T); R = purine (A or G) theo phương pháp của Panangala và cộng sự (2007) [14]. Các chủng vi khuẩn được nuôi trong 10 mL môi trường PYES ở 28°C trong vòng 48 giờ. Sau đó dung dịch vi khuẩn được ly tâm ở tốc độ 13.000 vòng/phút. Bỏ phần dịch nổi, vi khuẩn thu được rửa bằng nước muối sinh lý 0,86% NaCl. Sau đó, cho 1 mL dung dịch đệm TE (Tris-Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Oxoid, UK) (10 mM Tris, 1 mM EDTA) vào và trộn đều với vi khuẩn bằng máy Vortex và đun ở nhiệt độ 98°C trong vòng 10 phút. Sau đó, làm lạnh nhanh bằng nước đá để chấm dứt phản ứng. Dung dịch thu được đem ly tâm ở tốc độ 14.000 vòng/phút.

Loại bỏ phần cặn, thu dịch nổi (ADN) và bảo quản ở nhiệt độ -20°C để sử dụng cho phản ứng PCR. ADN của vi khuẩn *F. columnare* cung cấp từ Trường Đại học Stirling (Scotland, Vương quốc Anh) được sử dụng làm đối chứng dương và dung dịch nước không chứa ADN được sử dụng làm đối chứng âm.

Sản phẩm PCR sau khi khuếch đại được điện di trên gel agarose 1% (Abgene, UK) trong dung dịch đệm TAE 0,5X (10 mM Tris, 5 mM acetate, 0,1 mM EDTA). Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với ADN của vi khuẩn *F. columnare* có kích thước 504 bp.

2.4. Phương pháp xác định một số đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được

Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa được sử dụng để định danh vi khuẩn gồm có các phản ứng cơ bản: Nhuộm gram, oxidase, phản ứng oxi hoá/lên men đường glucose (O/F glucose), phản ứng congo red (0,006%) và phản ứng tạo sắc tố flexirubin [4]. Ngoài ra, đặc điểm sinh hóa các chủng vi khuẩn phân lập cũng được khảo sát bằng bộ kit API 20E (Analytical profile index) (Bio-Mérieux, Pháp) theo hướng dẫn của nhà sản xuất, các phản ứng được ủ ở nhiệt độ 28°C và đọc kết quả sau 48 giờ. Chủng vi khuẩn *F. columnare* của Trường Đại học Stirling cung cấp được sử dụng để làm kết quả so sánh.

2.5. Phương pháp gây bệnh thực nghiệm

2.5.1. Chuẩn bị vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập được nuôi cấy trên môi trường PYES agar ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ. Sau đó, lấy 01 khuẩn lạc rơi trên đĩa thạch và tiến hành nuôi cấy tăng sinh trong 10 mL môi trường lỏng PYES ở máy ủ lắc (Shaking incubator) (LM-4200, Yinder, Trung Quốc) với nhiệt độ 28°C, tốc độ 100 vòng/phút trong 48 giờ. Dung dịch vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 4.000 vòng/phút trong 20 phút bằng máy ly tâm (Digisystem Laboratory Instruments Inc., Đài Loan), loại bỏ phần dịch nổi và thu phần vi khuẩn. Cho 10 mL dung dịch nước muối sinh lý 0,86% NaCl vào để tạo dịch huyền phù. Lấy 1 mL huyền phù vi khuẩn đo OD bằng máy so màu quang phổ (Spectrophotometer model 4111 RS, Zuzi, Tây Ban Nha) ở bước sóng 600 nm, dùng nước muối sinh lý pha loãng đến giá trị OD = 1 (tương đương 10^8 cfu/mL, số liệu không công bố). Sau đó pha loãng vi khuẩn theo các mật độ từ 10^3 - 10^7 cfu/mL.

2.5.2. Cá thí nghiệm

Cá sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm là cá rô phi (*Oreochromis sp.*) có khối lượng khoảng 30 g/con, khỏe mạnh nhận từ Trung tâm Giống thủy sản Thừa Thiên - Huế. Cá được nuôi thuần 14 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm.

Trước khi tiến hành thí nghiệm cảm nhiễm, đàn cá được kiểm tra không cảm nhiễm vi khuẩn bằng cách thu mẫu vi khuẩn từ não và mang của 10 con cá ngẫu nhiên [15]. Dùng que cấy nhựa tiết trùng đâm thẳng vào khối não hoặc mang của cá rồi cấy lên môi trường Tryptic Soy Agar (TSA, HiMedia, Ấn Độ) và PYES agar đã được chuẩn bị sẵn. Dùng parafin bao kín lại và giữ ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ.

2.5.3. Thí nghiệm xác định liều gây chết 50% (LD_{50} Lethal dose 50)

Từ kết quả của thí nghiệm công cường độc lực, 3 chủng vi khuẩn *F. columnare* gồm chủng NNP01010218 phân lập tại phường Tứ Hạ, chủng NNP02010118 thu tại xã Bình Điền (thị xã Hương Trà) và chủng NNP03020118 thu tại phường Phú Bài (thị xã Hương Thủy) được chọn để xác định liều gây chết LD_{50} . Thí nghiệm xác định giá trị LD_{50} được bố trí trên 7 nghiệm thức, bao gồm: 6 nghiệm thức thí nghiệm và 01 nghiệm thức đối chứng. Mỗi nghiệm thức gồm 10 con cá được nuôi trong bể nhựa (V = 50 L). Cá trước khi cảm nhiễm được gây mê bằng Aquis (Bayer, Việt Nam) với liều lượng 0,02 mL/L nước [15]. Trong 6 nghiệm thức thí nghiệm: cá ở mỗi nghiệm thức được ngâm với một trong sáu mật độ vi khuẩn *F. columnare* từ 1×10^8 đến 1×10^3 cfu/mL trong 30 phút. Ở nghiệm thức đối chứng, cá được ngâm với nước muối sinh lý (0,86% NaCl) vô trùng trong 30 phút. Cá sau khi cảm nhiễm được nuôi trong bể nhựa 50 L với hệ thống nước chảy tốc độ 14 L/phút, nhiệt độ 28-30°C. Cho ăn hàng ngày (2% khối lượng thân) bằng thức ăn Cargill (Việt Nam). Sự liên tục 24 giờ/ngày. Tỷ lệ chết được theo dõi trong

14 ngày. Giá trị LD_{50} được xác định theo phương pháp của Reed và Muench (1938) [17].

Dựa vào số lượng cá chết ở các nghiệm thức để tính LD_{50} theo công thức sau:

$$LD_{50} = 10^{x*}$$

Trong đó: a là số lỵ thừa mà tại đó vi khuẩn gây cá chết thấp nhất (trên 50%).

x được tính dựa vào công thức: $x = (P_a - 50) / (P_a - P_0)$.

Với: P_a là tỷ lệ chết cận trên và P_0 là tỷ lệ chết cận dưới của liều gây chết 50%.

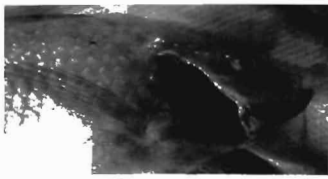
2.6. Phương pháp thử độ nhạy kháng sinh

Khả năng miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo phương pháp của Bauer và cộng sự (1966) [3].

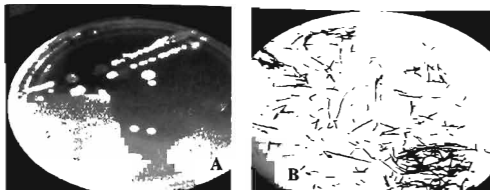
Dùng que cấy tiết trùng lấy khuẩn lạc trên đĩa vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa 10 mL nước muối sinh lý (0,85% NaCl) đã tiết trùng. Trộn đều và xác định mật độ vi khuẩn đạt 10^8 cfu/mL, lấy 100 μ L huyền phù vi khuẩn cấy trên môi trường Mueller-Hinton pha loãng 2 lần để giảm lượng dinh dưỡng (HiMedia, Ấn Độ), để khô khoảng 10 phút sau đó đặt các khoanh giấy có tẩm các loại kháng sinh tetracycline (TE/30 μ g), ampicillin (AM/10 μ g), amocillin (AMO/10 μ g) và trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT/1,25/23,75 μ g) lên đĩa thạch, ủ ở nhiệt độ 28°C. Tiến hành đo đường kính vòng vô khuẩn sau 48 giờ. Đánh giá khả năng nhạy cảm hay kháng kháng sinh của vi khuẩn dựa trên dựa trên đường kính vòng vô khuẩn theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute [5].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập và định danh vi khuẩn bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu



Hình 1. Các vết thương tổn trên mang cá rô phi (A) hay mang cá chuyển sang màu vàng nhạt (B) khi bị nhiễm khuẩn *F. columnare*.



Hình 2. Khuẩn lạc màu vàng khi nuôi cấy trên môi trường PYES agar (A) và hình dạng vi khuẩn khi nhuộm Gram (B)

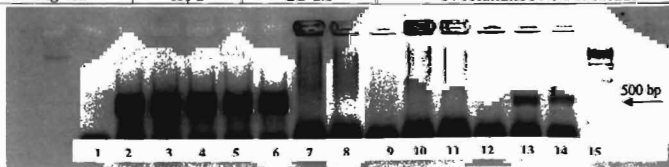
Từ 35 mẫu cá rô phi bị bệnh thu được tại các hộ nuôi cá lồng ở Thừa Thiên - Huế đã phân lập được 11 chủng vi khuẩn chiếm ưu thế trên môi trường nuôi cấy đặc trưng PYES. Có 10/35 mẫu cá có dấu hiệu tổn thương mang (Hình 1A), hoặc mang chuyển màu sang vàng nhạt (Hình 1B), đây là các dấu hiệu đặc trưng của sự cảm nhiễm vi khuẩn *F. columnare* trên cá nước ngọt [8, 16, 23]. Các chủng vi khuẩn này phát triển trên môi trường PYES tạo khuẩn lạc vàng (Hình 2A) và vi khuẩn có dạng hình sợi (Hình 2B).

Việc phân lập vi khuẩn *F. columnare* từ mẫu cá bệnh gặp nhiều khó khăn, do vi khuẩn *F. columnare*

phát triển chậm hơn các loại vi khuẩn khác nên thường bị ức chế bởi sự phát triển của vi khuẩn khác. Việc bổ sung 1 µg/mL tobramycin [6] vào môi trường nuôi cấy mặc dù không ức chế hoàn toàn sự phát triển của các vi khuẩn khác (Hình 2A) nhưng đã giúp vi khuẩn *F. columnare* chiếm ưu thế và tạo được dòng thuần sau 1 lần cấy chuyển. Các chủng vi khuẩn sau khi cấy chuyển được định danh bằng phương pháp PCR với cặp mồi đặc hiệu FcFd và FcRs. Kết quả phân lập và định danh 11 chủng vi khuẩn từ mang của mẫu cá bệnh bằng phương pháp PCR được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Kết quả định danh bằng PCR của các mẫu cá bệnh ở Thừa Thiên - Huế

Địa điểm thu mẫu	Mẫu thu	Kết quả định danh (chủng)
Phường Tứ Hạ, thị xã Hương Trà	Hộ 1	HT 1.1
		HT 1.2
		HT 1.3
	Hộ 2	HT 2.1
	Hộ 3	HT 3.1
		HT 3.2
Phường Phú Bài, thị xã Hương Thủy	Hộ 1	HHT 1.1
		HHT 1.2
		HHT 1.3
	Hộ 2	HHT 2.1
		HHT 2.2
Xã Bình Điền, thị xã Hương Trà	Hộ 1	BĐ 1.1
	Hộ 2	BĐ 2.1



Hình 3. Kết quả PCR của các chủng *F. columnare* phân lập được. 1: đối chứng âm; 2 - 12: mẫu vi khuẩn phân lập được, 13 và 14: đối chứng dương (ADN của chủng *F. columnare* từ Đại học Stirling, Scotland, Vương quốc Anh); 15: thang 1 kb

11 chủng vi khuẩn tạo khuẩn lạc vàng trên môi trường PYES agar đều cho sản phẩm sau điện di ở kích thước 504 bp, cho phép kết luận chính xác 11 chủng này là vi khuẩn *F. columnare* (Hình 3).

3.2. Kết quả kiểm tra đặc điểm sinh hóa các chủng vi khuẩn phân lập được

Từ các đặc tính sinh hoá đặc trưng của *F. columnare* như tạo khuẩn lạc vàng, thuộc nhóm vi khuẩn gram âm, có dạng hình sợi, tạo sắc tố trên flexirubin và congo red, cho phản ứng catalase, oxidase dương tính cho thấy 11 chủng *F. columnare* phân lập được tại Thừa Thiên - Huế khá đồng nhất về mặt sinh hóa (Bảng 2). Tất cả các chủng phân lập được đều có khả năng di động trượt. Khả năng di động này giúp *F. columnare* có thể di chuyển trực tiếp trong môi trường nước cũng như dễ dàng tiếp cận mang và da cá [18]. 100% các chủng không phát

triển trên môi trường TSA và không sử dụng các loại đường như glucose, ribose, mannitol,... 10/11 chủng có khả năng tiết ra galatinase, đây là đặc điểm quan trọng giúp nó có khả năng phá hủy sợi collagen trong các biểu mô liên kết ở mang và da, tạo ra những tổn thương trên các cơ quan này ở cá [9]. Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá các chủng *F. columnare* phân lập được trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên Huế khá đồng nhất với các chủng *F. columnare* mà Từ Thanh Dung và cộng sự (2012) [9] đã phân lập được trên cá tra tại đồng bằng sông Cửu Long. Trong nghiên cứu này, tất cả các chủng đều phân lập được từ mang cá mà không phân lập được từ da như nghiên cứu của Từ Thanh Dung và cộng sự (2012) [9]. Tuy nhiên, kết quả từ một số nghiên cứu khác cho rằng hầu hết vi khuẩn *F. columnare* đều có thể phân lập được từ mang cá [7, 12].

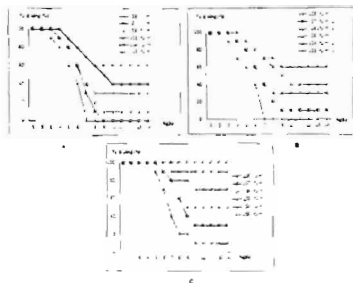
Bảng 2. Đặc điểm sinh hóa của các chủng *F. columnare* phân lập được từ mang cá rô phi bị bệnh

STT	Chỉ tiêu hình thái, sinh lý, sinh hoá	<i>F. columnare</i> (Đại học Stirling, Vương quốc Anh)	Tỷ lệ % chủng vi khuẩn phân lập	
			Dương tính	Âm tính
1	Nhuộm gram	(-)	100	0
2	Hình thái	Hình sợi mảnh	Hình sợi mảnh	
3	Di động	Trượt	Trượt	
4	Oxidase	(+)		100
5	Catalase	(+)		100
6	Congo red	(+)	100	
7	Flexirubin	(+)	100	
8	Voges-Proskauer	(-)	9,9	90,1
9	Gelatin	(+)	90,1	9,9
10	Glucose	(-)		100
11	Ribose	(-)		100
12	Arabinose	(-)		100
13	Manitol	(-)		100
14	Sorbitol	(-)		100
15	Lactose	(-)		100
16	Trehalose	(-)		100
17	Inulin	(-)		100
18	Rafinose	(-)	9,9	90,1
19	Glycogen	(-)		100
20	Citrate	(-)		100
21	Indole	(-)		100
22	NaCl 1%	(-)		100
23	TSA	(-)		100

(+): phản ứng dương tính; (-) phản ứng âm tính. Chủng *F. columnare* từ Đại học Stirling, Vương quốc Anh được sử dụng để làm kết quả so sánh

3.3. Kết quả gây bệnh thực nghiệm trên cá rô phi

Khả năng gây chết của chủng vi khuẩn *F. columnare* NNP01010218, chủng NNP02010118 và chủng NNP03020118 trên cá rô phi (*Oreochromis* sp.) ở các mật độ vi khuẩn khác nhau được thể hiện ở hình 4.



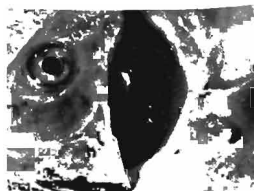
Hình 4. Tỷ lệ sống (%) của cá rô phi sau khi cảm nhiễm *F. columnare* NNP01010218 (A), NNP02010118 (B) và NNP03020118 (C)

Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm gây bệnh thực nghiệm trên cá rô phi bằng các chủng vi khuẩn đã phân lập được cho thấy vi khuẩn *F. columnare* có khả năng gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên - Huế với ngưỡng gây chết 50% từ $6 \times 10^3 - 10^6$ cfu/mL (Bảng 3)

Bảng 3. Liều gây chết LD₅₀ của các chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập được

STT	Chủng	LD ₅₀ (cfu/mL)
1	<i>F. columnare</i> NNP01010218	6×10^3
2	<i>F. columnare</i> NNP02010118	1×10^4
3	<i>F. columnare</i> NNP03020118	10^6

Các dấu hiệu bệnh lý ở cá rô phi sau khi được gây bệnh thực nghiệm với mang bị tổn thương ở nghiên cứu này (Hình 5) hoàn toàn giống với các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của cá rô phi bị bệnh thu được ngoài tự nhiên. Kết quả tải định danh vi khuẩn *F. columnare* sau cảm nhiễm trong nghiên cứu này chứng tỏ các chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập được là tác nhân gây bệnh cho cá rô phi trong nghiên cứu này.



Hình 5. Dấu hiệu tổn thương ở mang cá rô phi khi cảm nhiễm vi khuẩn *F. columnare*

3.4. Khả năng miễn cảm của các chủng *F. columnare* đối với một số loại kháng sinh

Kết quả thử khả năng miễn cảm của *F. columnare* với 4 loại kháng sinh ampicillin (10 µg), amoxicillin (10 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1,25/ 23,75 µg) và tetracycline (30 µg) lần lượt là 100%; 81,8%; 27,3% và 0%. Tetracycline và trimethoprim-sulfamethoxazole là hai nhóm kháng sinh được dùng phổ biến trong nuôi trồng thủy sản hiện nay. Kết quả nghiên cứu này khá tương đồng với kết quả thử nghiệm *F. columnare* phân lập trên cá tra nuôi tại đồng bằng sông Cửu Long với 85% các chủng *F. columnare* miễn cảm với tetracycline [9]. Các chủng *F. columnare* gây bệnh trên cá heo ở Mỹ đã được chứng minh cũng miễn cảm với tetracycline và trimethoprim-sulfamethoxazole [20]. Các nghiên cứu trên thế giới cho rằng có thể dùng kháng sinh tetracycline (20 ppm) tắm cho cá trong trường hợp mang và da bị hoại tử do vi khuẩn *F. columnare* gây ra [2; 7].

Ampicillin và amoxicillin là hai loại kháng sinh thuộc nhóm β-lactam có phổ kháng khuẩn trung bình, tác dụng mạnh trên vi khuẩn gram (+) nên trong nghiên cứu này, *F. columnare* phản lập trên cá rô phi ở Thừa Thiên - Huế đều kháng với 2 loại kháng sinh này. Theo nghiên cứu của Từ Thanh Dung và cộng sự (2012) [9] thì 85% chủng *F. columnare* phân lập từ cá tra cũng nhạy với ampicillin. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh hiện nay không được khuyến khích trong nuôi trồng thủy sản nhằm đảm bảo chất lượng vật nuôi và hạn chế ô nhiễm môi trường.

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu đã phân lập được 11 chủng *F. columnare* gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại tỉnh Thừa Thiên - Huế. Các chủng *F. columnare* hầu như đồng

nhất về mặt sinh hóa. Các chủng vi khuẩn phát triển trên môi trường PYES sau 48 giờ ở 28°C tạo khuẩn lạc nhỏ, hình tròn, có màu vàng. Các chủng này đều là vi khuẩn gram âm, hình sợi mảnh, di động theo dạng trượt, oxidase và catalase dương tính, phản ứng màu với Congo red và flexirubin.

Liều gây chết 50% cá thí nghiệm của 3 chủng: *F. columnare* NNP01010218, *F. columnare* NNP02010118 và *F. columnare* NNP03020118 phân lập được trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên - Huế dao động từ 6×10^3 đến 10^6 cfu/mL.

Các chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập được trên cá rô phi nuôi tại Thừa Thiên - Huế mẫn cảm với tetracycline và trimethoprim-sulfamethoxazole.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anderson, J. I. W. and Conroy, D. A. (1969). The pathogenic myxobacteria with special reference to fish disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 32, 30-39.
2. Anonymous (1986). Treatment of columnaris disease. For Fish Farmers No. 86-1. Mississippi Cooperative Extension Service, Mississippi State University, p. 1-2.
3. Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45, 493-496.
4. Buller, N. B. (2004). Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI Publishing, 394 pp.
5. CLSI (2016). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
6. Decostere, A. (1996). *Flavobacterium columnare* infection in fish: The agent và its adhesion to the gill tissue. Ph.D thesis. Universiteit Ghent, 152pp.
7. Decostere, A., Haesebrouck, F., Turnbull, J. F., Charlier, G. (2001). Influence of water quality and temperature on adhesion of high và low virulence *Flavobacterium columnare* strains to isolated gill arches. *Journal of Fish Disease*, 22, 1-11.
8. Declercq, A. M., Haesebrouck, F., Van den Broeck, W., Bossier P., Decostere, A. (2013). Columnaris disease in fish: a review with emphasis

on bacterium-host interactions. *Veterinary Research*, 44:27 (17 pp). <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-27>.

9. Từ Thanh Dung, Nguyễn Thị Tiên, Nguyễn Anh Tuấn (2012). Nghiên cứu tác nhân gây bệnh trắng đuôi trên cá tra và giải pháp phòng trị. *Tạp chí Khoa học - Đại học Cần Thơ*, 22, 136-145.

10. Eissa, A. E., Zaki, M. M. and Aziz, A. (2010). *Flavobacterium columnare*/Myxobolus infection in the Earthen pond reared Nile Tilapia during the early summer. *Interdisciplinary Bio Central* 2 (5), 1-8. <https://doi.org/10.4051/ibc.2010.2.2.0005>.

11. Fijan, N. N. (1969). Antibiotic additives for the isolation of *Chondrococcus columnaris* from fish. *Journal of Applied Microbiology*, 17, 333-334.

12. Morris, J. M., Snyder-conn, E., Foott, J. S., Holt, R. A., Suedkamp, M. J., Lease, H. M., Clearwater, S. J., Meyer, J. S. (2006). Survival of lost River Suckers (*Delistes luxatus*) challenged with *Flavobacterium columnare* during exposure to sublethal ammonia concentration at pH 9.5. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 50, 256-263.

13. Ordal, E. J. and Rucker, R. R. (1944). Pathogenic myxobacteria. *Proceedings of Society Experimental Biology and Medicine*, 56, 15-18.

14. Panangala, V. S., Shoemaker, C. A., Van Santen, V. L., Dybvig, K., Kjesius, P. H. (2007). Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*. *Diseases of Aquatic Organism*, 74, 199-208. <https://doi.org/10.3354/dao074199>

15. Nguyễn Ngọc Phước, Lưu Thị Ngọc Hạnh, Nguyễn Thị Sao, Nguyễn Đức Quỳnh Anh, Trương Thị Hoa, Lê Văn Bảo Duy (2015). Nghiên cứu đặc điểm sinh hóa vi khuẩn *Streptococcus* sp. gây bệnh trên cá rô phi nuôi tại đồng bằng sông Cửu Long, Việt Nam. *Tạp chí Khoa học - Đại học Huế*, 104 (05), 207-210.

16. Pilarski, F., Rossini, A. J. and Ceccarelli, P. S. (2008). Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al. 2002) from four tropical fish species in Brazil. *Brazilian Journal of Biology*. 68 (2), 409-414.

17. Reed, L. J. and Muench, H. (1938). A simple method of estimating fiftypercent endpoints. American Journal of Epidemiology, 27(3), 493-497.
18. Salyers, A. A. and Whitt, D. D. (1994). Bacterial pathogenesis: A molecular approach. 1st Ed., America Society for Microbiology Press, Washington, D. C. 418pp.
19. Shieh, H. S. (1980). Studies on the nutrition of a fish pathogen, *Flexibacter columnaris*. Microbios Letter, 13, 129-133.
20. Thomas-Jinu, S. and Goodwin, A. E. (2004). Morphological and genetic characteristics of *Flavobacterium columnare* isolates: correlations with virulence in fish. Journal of Fish Disease, 27, 29-35.
21. Tien, N. T., Tuan, N. A., Dung, T. T., Crumlish, M. (2012). First identification of *Flavobacterium columnare* infection in farmed freshwater striped catfish (*Megalopterus albus*). Diseases of Aquatic Organism, 100, 83-88.
22. Triyanto and Wakabayashi, H. (1999). Genotypic diversity of strains of *Flavobacterium columnare* from diseased fishes. Fish Pathology, 34, 65-71.
23. Wakabayashi, H. (1993). Columnaris disease. In "Bacterial diseases of fish" (ed. by V. Inglis, R. J. Roberts and N. R. Bromage). Blackwell Sci. Pub., London, pp. 23-39.

PRELIMINARY STUDY ON THE INFECTION OF *Flavobacterium columnare* IN FARMED TILAPIA IN THUA THIEN - HUE PROVINCE

Nguyen Ngoc Phuoc, Nguyen Thi Hue Linh, Nguyen Thi Xuan Hong

Summary

Flavobacterium columnare is responsible for one of the most severe diseases to affect tilapia aquaculture worldwide. In this study, 11 isolates of *Flavobacterium* was recovered from diseased tilapia that showed typical clinical signs in gill such as ulcerative and greyish white gills. All isolates were recovered in gills from natural diseased fish in 7 tilapia farms at 2 towns: Huong Tra, Huong Thuy, Thua Thien - Hue province. All isolates were identified as *Flavobacterium columnare* by PCR with specific primers FcFd and FcRs for *F. columnare*. Biological characteristics of these isolates were homogeneous. They were long filamentous, gram negative, absorption of Congo red dye and production of flexirubin type pigments. The lethal dose 50 of these isolates in experimental tilapia were $6 \times 10^3 - 10^6$ cfu/mL. The result of antibiotic resistant test showed that most of these isolates were sensitive to tetracycline, trimethoprim-sulfamethoxazol and resistant to ampicillin, and amoxicillin.

Keywords: *Tilapia*, *Oreochromis sp.*, *Flavobacterium columnare*, Thua Thien - Hue.

Người phản biện: PGS.TS. Tô Long Thành

Ngày nhận bài: 20/12/2019

Ngày thông qua phản biện: 21/01/2020

Ngày duyệt đăng: 31/01/2020