Tạp chí Khoa học Quốc tế AGU
ISSN 0866 - 8086

XÁC ĐỊNH TÁC NHÂN GÂY BỆNH TRÊN LƯƠN ĐỒNG GIỐNG TẠI AN GIANG

Nguyễn Thị Thuý Hằng[(1)], Nguyễn Hữu Yến Nhi[(1)], Phan Phương Loan[(1)], Nguyễn Thị Bích Hạnh[(1)], Trịnh Thị Lan[(1)]

[1,]*Trường Đại học An Giang, Đại học Quốc gia TP. HCM*

Thông tin chung:
Ngày nhận bài: 12/10/2023
Ngày nhận kết quả bình duyệt: 10/03/2024
Ngày chấp nhận đăng: 09/2024

Title:
Determining the cause of disease in eel fingerling in An Giang

Keywords:
Eel Fingerlings, Monopterus Albus, E. Tarda, Pathogen Identification

Từ khóa:
Lươn giống, Monopterus albus, E. Tarda, xác định tác nhân gây bệnh

ABSTRACT

The study was conducted to identify the causative agent of disease in eel fingerlings in An Giang. The research utilized bacterial isolation on TSA medium, followed by gene sequencing and a search of the GenBank database for identification. The results from isolating bacteria from sick eel samples, which exhibited pathological signs such as detachment from the substrate, weak activity, loss of appetite, and numerous hemorrhagic spots on the abdomen, showed colonies that were cream and pale yellow in color. Sequencing of 15 bacterial strains identified three species: Plesiomonas shigelloides and Staphylococcus pasteuri, each accounting for 13%, while Edwardsiella tarda accounted for 73.33%. The LD50 determination for Edwardsiella tarda was 4.6x10^4 CFU/mL. Additionally, the results of bacterial re-identification confirmed Edwardsiella tarda as the causative agent of the disease in eels, showing pathological signs similar to those observed in the originally collected eels.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm tìm ra được tác nhân gây bệnh trên lươn giống tại An Giang. Nghiên cứu sử dụng phương pháp phân lập vi khuẩn trên môi trường TSA và định danh bằng giải trình tự gen và tra cứu cơ sở dữ liệu ngân hàng gen. Kết quả nghiên cứu cho thấy những mẫu lươn bệnh có dấu hiệu bệnh lý lâm sàng như tách giá thể, hoạt động yếu, bỏ ăn, có nhiều đốm xuất huyết ở mặt bụng, mặt khác kết quả phân lập vi sinh cũng tìm thấy những đặc điểm khuẩn lạc có màu kem và màu vàng nhạt. Về kết quả định danh bằng phương pháp giải trình tự 15 chủng vi khuẩn được 3 loài bao gồm Plesiomonas shigelloides và Staphylococcus pasteuri chiếm 13% trên mỗi chủng. Trong khi đó, loài Edwardsiella tarda chiếm 73,33%. Kết quả xác định LD50 của Edwardsiella tarda là 4,6x104 CFU/mL. Đồng thời, kết quả tái định danh vi khuẩn cũng xác định được vi khuẩn Edwardsiella tarda là tác nhân gây bệnh trên lươn giống với những dấu hiệu bệnh lý tương đồng với biểu hiện bệnh lý lươn giống thu về ban đầu.

1. GIỚI THIỆU

Lươn đồng (*Monopterus albus*) là một trong những đối tượng thủy sản đang được nhiều người quan tâm trong thời gian gần đây do chất lượng thịt thơm ngon, giá thành ổn định và đem lại nguồn thu nhập cao cho người dân. Hiện nay, lươn đồng đang trở thành một trong những đối tượng xuất khẩu rất được ưa chuộng ở các thị trường ngoài nước như Trung Quốc, Hồng Kông và Nhật. Tuy nhiên, quá trình sản xuất giống và nuôi thương phẩm lươn gặp rất nhiều khó khăn về dịch bệnh cũng như chất lượng con giống. Trong đó, chất lượng con giống và tình hình bệnh xảy ra là yếu tố hàng đầu quyết định sự thành công của vụ nuôi. Theo kết quả khảo sát của Nguyễn Thị Kim Quyên (2020) cho rằng bệnh lươn trong quá trình sản xuất giống là khó khăn quan trọng nhất (66,7%) và có 60% số hộ cho rằng tỷ lệ sống từ lúc lươn bột tới lươn giống còn thấp (tỷ lệ sống từ 50% - 60%). Do đó, để tạo nguồn giống chất lượng cần tuân thủ nhiều quy chuẩn như GAP, BMP và CoC, tuyệt đối không sử dụng thuốc kháng sinh trong phòng bệnh và hạn chế sử dụng thuốc kháng sinh trong công tác điều trị bệnh trên lươn đồng.

Một số kết quả nghiên cứu về bệnh lươn cho thấy rằng lươn đồng rất dễ nhiễm khuẩn ở giai đoạn giống. Theo Kết quả điều tra 112 hộ nuôi lươn đồng của 3 tỉnh An Giang (40 hộ), Cần Thơ (38 hộ) và Hậu Giang (34 hộ) thấy các bệnh phổ biến trên lươn đồng nuôi là bệnh đường ruột (69,6%), bệnh đỉa lươn/vắt (62,5%), bệnh ghẻ/lở loét (42,9%), bệnh phù đầu/sốt (20,5%), bệnh xuất huyết (7,1%), bệnh tuột nhớt (5,4%), bệnh nấm thủy mi (0,9%). Đồng thời, một nghiên cứu khác đã xác định được 5 nhóm vi khuẩn trong các mẫu lươn bệnh gồm *A.hydrophyla, Aeromona*s spp., *E. tarda, Lactococus* spp. và *Streptobacillus* spp (Nguyễn Thị Thu Hằng và cs., 2012). Mặc dù đã xác định được nhiều chủng vi khuẩn gây bệnh trên lươn đồng, tuy nhiên bệnh xuất huyết trên lươn đã được xác định tác nhân chính gây nên là do vi khuẩn Aeromonas hydrophyla. Bằng chứng là kết quả nghiên cứu của Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Đức Hiền (2012) đã xác định tác nhân chính gây bệnh xuất huyết trên Lươn đồng là do vi khuẩn *Aeromonas hydrophyla* gây ra. Đây là tác nhân gây bệnh thường xuyên trên lươn đồng từ giai đoạn giống đến thương phẩm. Do đó, đây là tác nhân cần được quan tâm nghiên cứu để có biện pháp phòng và trị bệnh hiệu quả hơn trong tương lai.

Đồng thời, thực hiện theo quyết định ban hành kế hoạch hành động thực hiện chiến lược phát triển thủy sản giai đoạn năm 2021 – 2030, tầm nhìn đến năm 2045 của tỉnh An Giang rằng cần nghiên cứu công nghệ phát triển chế phẩm sinh học, sản phẩm nguồn gốc thảo dược thay thế dần việc sử dụng hóa chất kháng sinh trong phòng trị bệnh thủy sản cho một số đối tượng kinh tế chủ lực của tỉnh như cá tra, lươn, tôm càng xanh, cá chạch lấu,... Do đó, việc nghiên cứu và tìm ra tác nhân chính gây bệnh lươn đồng giống ở An Giang là rất cần thiết nhằm giúp người nuôi có biện pháp phòng trị hiệu quả hơn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu, địa điểm và thời gian.

Vật liệu:

- Lươn đồng giống có trọng lượng khoảng 2 – 5 g/con.
- Môi trường Tryptic Soy Agar - TSA (Merck, Đức).
- Môi trường Nutrient Broth – NB (Merck, Đức).
- Nước muối sinh lý 0,85% cùng một số dụng cụ và thiết bị cần thiết trong phòng thí nghiệm.

Địa điểm:

- Địa điểm nghiên cứu: Trường Đại học An Giang.
- Địa điểm thu mẫu: Châu Thành và Thành phố Long Xuyên.

Thời gian nghiên cứu: từ tháng 4/2022 đến 8/2023.

2.2 Phương pháp phân lập và định danh vi khuẩn gây bệnh trên lươn đồng giống.

Phương pháp thu mẫu: Thông qua việc ghi nhận thông tin và thu mẫu bệnh lươn đồng giống và vận chuyển về phòng thí nghiệm để phân tích mẫu. Thu khoảng 15 – 30 mẫu lươn đồng giống có dấu hiệu bệnh như lờ đờ, bỏ ăn, xuất huyết.

Thu mẫu lươn bệnh có dấu hiệu bệnh lý do vi khuẩn gây ra như xuất huyết, đốm đỏ trên thân. Mẫu lươn bệnh được vận chuyển sống về phòng thí nghiệm để phân lập và định danh. Phân lập vi khuẩn trên gan và thận của lươn bằng môi trường Trypton Soy Agar (TSA). Quan sát ghi nhận đặc điểm của khuẩn lạc. Vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường Nutrient Broth (NB).

Phương pháp phân lập vi khuẩn qua các bước sau: Giải phẫu lươn và khử trùng bề mặt các cơ quan cần phân lập như gan, thận và tỳ tạng. Dùng dao tiệt trùng rạch một đường nhỏ trên cơ quan cần phân lập. Dùng que cấy tiệt trùng lấy một ít lại vị trí vừa rạch và cấy ria trên đĩa thạch TSA đã được chuẩn bị sẵn. Sau 24 giờ đến 48 giờ ghi nhận đặc điểm của từng khuẩn lạc và cấy thuần vi khuẩn để định danh vi khuẩn.

2.3 Phương pháp giải mã trình tự gen vi khuẩn

Mẫu vi khuẩn phân lập từ lươn đồng giống được giải mã trình tự gen Sanger và được thực hiện tại công ty Cổ phần Phù Sa Genomics: Tiến hành giải trình tự sản phẩm với từng mồi 27F và 1492R riêng biệt cho sản phẩm bằng kĩ thuật giải trình tự Sanger trên thiết bị ABI 3500 (Thermo Fisher). Kết quả giải trình tự thu được dưới dạng file .ab1. Lắp ráp kết quả giải trình tự của hai mồi, đối chiếu với dữ liệu gen trên ngân hàng NCBI và lựa chọn những loài có trình tự tương đồng cao để xác định loài.

2.4 Phương pháp xác định LD50 của vi khuẩn gây bệnh trên lươn đồng giống

Vi khuẩn sau khi định danh sẽ được nuôi tăng sinh trong môi trường lỏng NB và xác định mật độ bằng phương pháp so màu quang phổ ở bước sóng 625 nM, OD ≈ 1. Mật độ vi khuẩn tương đương 10^8 CFU/mL. Mật độ vi khuẩn được pha loãng ở các nồng độ 10^7 CFU/mL, 10^6 CFU/mL, 10^5 CFU/mL, 10^4 CFU/mL để cảm nhiễm lươn. Lươn khỏe được bố trí và bể với mật độ 10 lươn/bể. Mỗi nồng độ cảm nhiễm được lặp lại 3 lần. Thời gian thí nghiệm 14 ngày. Lươn được theo dõi hằng ngày và ghi nhận số lươn chết trong quá trình thí nghiệm.

Nồng độ vi khuẩn gây chết 50% lươn thí nghiệm (LD50) được xác định theo công thức của Reed và Muench (1938): LD50 = $10^{a\text{-}p.d.}$ Trong đó: p.d = (L% - 50/L% - H%); a: số lũy thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết lươn thấp nhất nhưng trên 50%; H%: tỷ lệ lươn chết cao nhất nhưng dưới 50%; L%: tỷ lệ lươn chết thấp nhất nhưng trên 50%.

2.5 Thí nghiệm xác định tác nhân gây bệnh trên lươn đồng giống

Dựa vào định đề Robert Koch để xác định tác nhân gây bệnh. Bố trí lươn đồng giống vào bể nước sạch. Sử dụng vi khuẩn đã được phân lập và định danh để ngâm cảm nhiễm cho lươn đồng giống khỏe.

Thí nghiệm sử dụng lươn giống khỏe mạnh, đồng cỡ, màu sắc đồng đều, có khối lượng trung bình 2,11 g/con. Thí nghiệm được bố trí 2 nghiệm thức với 3 lần lặp lại bao gồm nghiệm thức đối chứng không tiêm cảm nhiễm vi khuẩn và nghiệm thức NT2 có tiêm cảm nhiễm vi khuẩn *E. tarda* T5 liều LD 50. Theo dõi biểu hiện và dấu hiệu bệnh lý của lươn đồng giống. Tái phân lập và định vi khuẩn bằng phương pháp giải mã trình tự gen và tra cứu Blast Search.

Nếu kết quả định danh là trùng khớp với vi khuẩn cảm nhiễm ban đầu thì kết luận rằng đây chính là tác nhân chính gây bệnh trên lươn đồng giống.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn gây bệnh trên lươn đồng giống

Kết quả phân lập những mẫu lươn có dấu hiệu bệnh lý như tách đàn, xuất huyết và lở loét, đặc biệt hậu môn sưng đỏ và lồi, vòm họng sưng kèm xuất huyết, da mất sắc tố và mất nhớt, mặt bụng có vết bầm (Hình 1A). Đồng thời, những dấu hiệu bên trong như gan và thận có màu đỏ sậm và xuất huyết (Hình 1B). Quan sát đặc điểm khuẩn lạc của các nhóm vi khuẩn cho thấy tất cả các nhóm vi khuẩn đều phát triển sau 24 giờ ở 30 ^{o}C trên môi trường TSA, vi khuẩn có khuẩn lạc màu kem (Hình C và E) và màu vàng nhạt (Hình D).

Kết quả giải trình tự gen của 15 chủng vi khuẩn được 3 nhóm loài vi khuẩn xuất hiện trên lươn giống. Bao gồm 2 chủng G2 và T7 định danh được vi khuẩn *Plesiomonas shigelloides* (Hình 2 A) có tỉ lệ tương đồng 97,17% đến 100%; 2 chủng G3 và T2 định danh được vi khuẩn *Staphylococcus pasteuri* (Hình 2 B) có tỉ lệ tương đồng 100%; 11 chủng T1, G5, T4, T5, GT1, GT2, G4, T3, T6, T8 và G9 định danh được vi khuẩn *Edwardsiella tarda* (Hình 2 C) có độ tương đồng từ 99% đến 100%, chiếm tỉ lệ 73,33% trên tổng số mẫu được giải trình tự (Bảng 1).

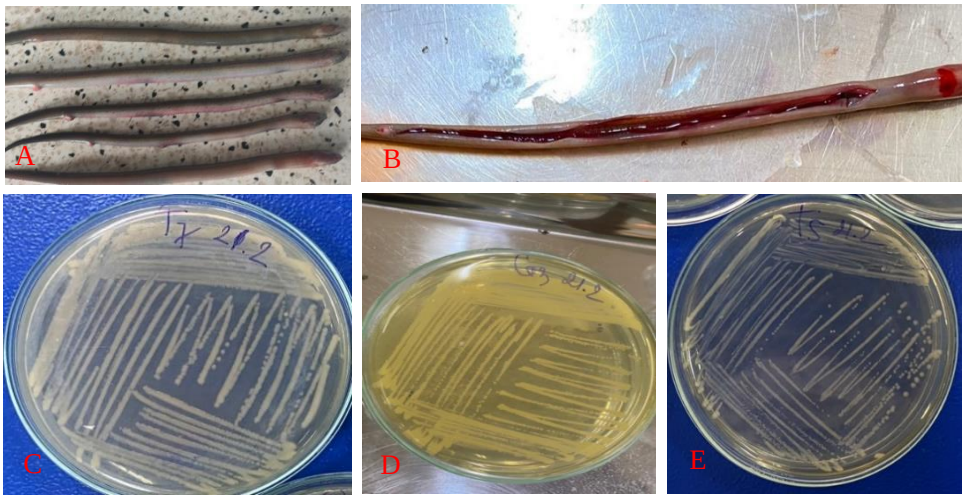
Bảng 1: Kết quả giải trình tự gen vi khuẩn trên lươn đồng giống.

STT	Tên mẫu	Chủng vi khuẩn	% tương đồng
1	G2	*Plesiomonas shigelloides*	100%
2	T7	*Plesiomonas shigelloides*	97,17%
3	G3	*Staphylococcus pasteuri*	100%
4	T2	*Staphylococcus pasteuri*	100%
5	T1	*Edwardsiella tarda*	99%
6	G5	*Edwardsiella tarda*	99%
7	T4	*Edwardsiella tarda*	100%
8	T5	*Edwardsiella tarda*	100%
9	GT1	*Edwardsiella tarda*	99%
10	GT2	*Edwardsiella tarda*	100%
11	G4	*Edwardsiella tarda*	99,29%
12	T3	*Edwardsiella tarda*	99,59%
13	T6	*Edwardsiella tarda*	99,29%
14	T8	*Edwardsiella tarda*	100%
15	G9	*Edwardsiella tarda*	99,19%

Vi khuẩn E. tarda là tác nhân gây bệnh phổ biến cho các đối tượng thủy sản nuôi (Ibrahim Adeshina và cs., 2023) và đã gây ra thiệt hại kinh tế đáng kể trong hoạt động nuôi trồng thủy sản

trên toàn thế giới (Khang Wen Goh và cs., 2023). Theo Ahmed H. Sherif và cs. (2020) vi khuẩn Edwardsiella tarda là một loại vi khuẩn gây bệnh cho cá có tỷ lệ tử vong cao trong nuôi trồng thủy sản và tác giả cũng cho rằng Lactobacillus plantarum, một loại prebiotic có đặc tính điều hòa miễn dịch, đã được sử dụng để cải thiện khả năng kháng bệnh ở cá rô phi sông Nile (Oreochromis niloticus). Theo Bùi Quang Tề (2006), vi khuẩn E. tarda có thể phát triển ở nồng độ muối 1,5 – 3% và di động được ở nhiệt độ từ 25 ^{o}C - 35 ^{o}C. Tuy nhiên, ở nhiệt độ 37 ^{o}C vi khuẩn hoạt động kém nhưng có thể tồn tại trong nước ao và trong bùn, đây là nguồn gây tái nhiễm lại cho cá. Vi khuẩn Edwardsiella tarda là một mầm bệnh nội bào gram âm gây thiệt hại kinh tế to lớn cho cá nước ngọt và nước biển nuôi và khi cá nhiễm vi khuẩn E. tarda thì gan, tụy, thận sưng huyết và phù nề (Xu và cs., 2014). Ngoài ra, nhiều nghiên cứu cho rằng vi khuẩn E tarda thường gây bệnh trên các loài cá nước ấm cá trê sông (Ictalurus punctata) và cá rô phi (Tilapia nilotic) (Từ Thanh Dung, 2008).

Một số nghiên cứu đã phân lập được vi khuẩn E. tarda gây bệnh trên một số loài cá da trơn khác như cá chình Châu Âu (Anguila anguila) trong điều kiện môi trường nước bị ô nhiễm, nhiệt độ nước thay đổi và gây tỉ lệ chết cao (Olga Haenen, 2011).



Hình 1: Dấu hiệu bệnh lý của lươn giống và đặc điểm khuẩn lạc. A – Dấu hiệu bên lý bên ngoài; B – Dấu hiệu bệnh lý bên trong; C – Đặc điểm vi khuẩn Plesiomonas shigelloides; D - Đặc điểm vi khuẩn Staphylococcus pasteuri; E - Đặc điểm vi khuẩn Edwardsiella tarda

Top 5 kết quả cho kết quả có độ tương đồng cao (>99%)

A

Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

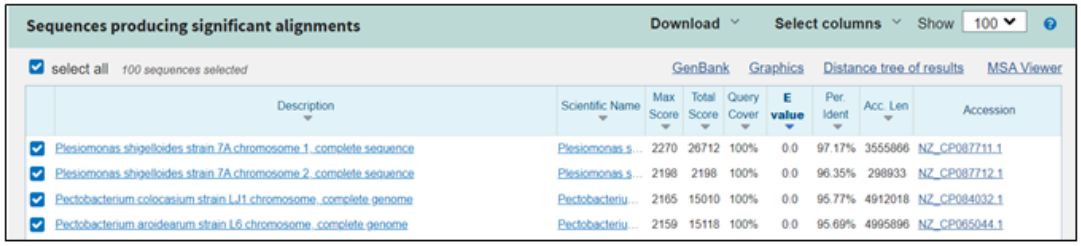
select all 100 sequences selected — GenBank — Graphics — Distance tree of results — MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Staphylococcus pasteuri strain CT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus....	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1487	MT072161.1
Staphylococcus sp. 8AQ partial 16S rRNA gene	Staphylococcus....	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1551	LR735455.1
Staphylococcus pasteuri strain A63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Staphylococcus....	2615	2615	100%	0.0	100.00%	1471	MN368257.1
Staphylococcus pasteuri strain 3C chromosome, complete genome	Staphylococcus....	2615	15657	100%	0.0	100.00%	2456297	CP031280.1
Staphylococcus pasteuri strain PL557 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA....	Staphylococcus....	2615	2615	100%	0.0	100.00%	4296	MK015858.1

Trình tự Staphylococcus pasteuri strain CT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (100% tương đồng)

Top 4 kết quả cho kết quả có độ tương đồng cao (>95%)

B



Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

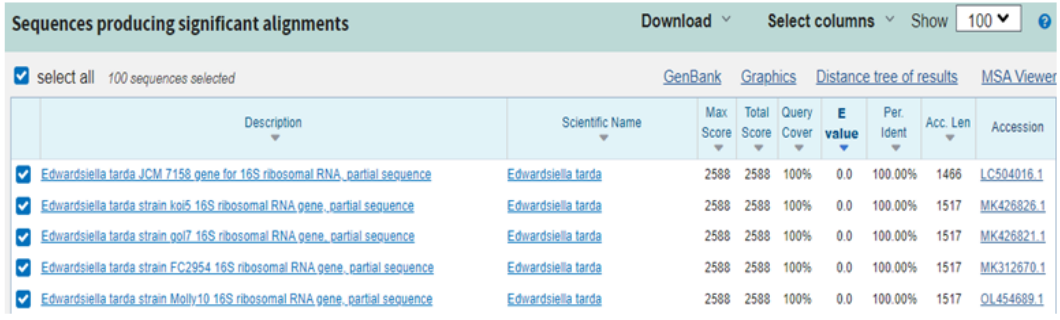
select all 100 sequences selected — GenBank — Graphics — Distance tree of results — MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Plesiomonas shigelloides strain 7A chromosome 1, complete sequence	Plesiomonas s...	2270	26712	100%	0.0	97.17%	3555866	NZ_CP087711.1
Plesiomonas shigelloides strain 7A chromosome 2, complete sequence	Plesiomonas s...	2198	2198	100%	0.0	96.35%	298933	NZ_CP087712.1
Pectobacterium colocasium strain LJ1 chromosome, complete genome	Pectobacteriu...	2165	15010	100%	0.0	95.77%	4912018	NZ_CP084032.1
Pectobacterium aroidearum strain L6 chromosome, complete genome	Pectobacteriu...	2159	15118	100%	0.0	95.69%	4995896	NZ_CP065044.1

Trình tự Plesiomonas shigelloides strain 7A chromosome 1, complete sequence (97.17% tương đồng)

Top 5 kết quả cho kết quả có độ tương đồng cao (100%)

C



Sequences producing significant alignments — Download — Select columns — Show 100

select all 100 sequences selected — GenBank — Graphics — Distance tree of results — MSA Viewer

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Edwardsiella tarda JCM 7158 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence	Edwardsiella tarda	2588	2588	100%	0.0	100.00%	1466	LC504016.1
Edwardsiella tarda strain koi5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Edwardsiella tarda	2588	2588	100%	0.0	100.00%	1517	MK426826.1
Edwardsiella tarda strain gol7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Edwardsiella tarda	2588	2588	100%	0.0	100.00%	1517	MK426821.1
Edwardsiella tarda strain FC2954 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Edwardsiella tarda	2588	2588	100%	0.0	100.00%	1517	MK312670.1
Edwardsiella tarda strain Molly10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	Edwardsiella tarda	2588	2588	100%	0.0	100.00%	1517	OL454689.1

Trình tự Edwardsiella tarda JCM 7158 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence (100% tương đồng)

Hình 2: Kết quả giải mã trình tự gen đại diện của 3 chủng vi khuẩn gây bệnh nhiễm khuẩn huyết, xuất huyết trên lươn giai đoạn giống. (A) mẫu T4; (B) mẫu G3; (C) mẫu T7

3.2 Kết quả xác định LD50 của vi khuẩn gây bệnh trên lươn đồng giống.

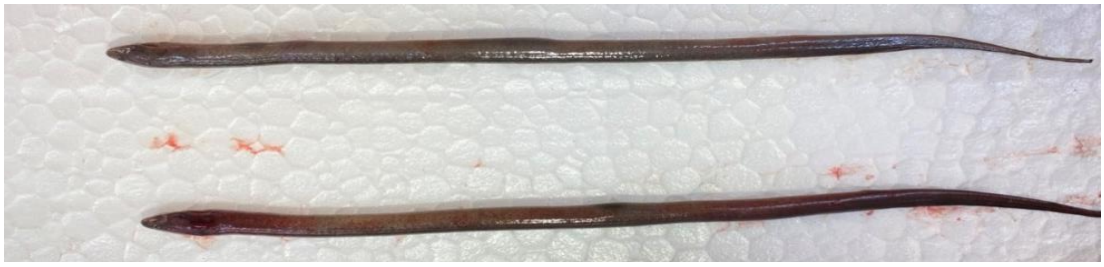
Thí nghiệm xác định giá trị LD50 của vi khuẩn *E. tarda* T5 để cảm nhiễm cho lươn giống. Kết quả thí nghiệm xác định giá trị LD50 của vi khuẩn *E. tarda* T5 gây bệnh trên lươn giống sau 14 ngày theo dõi được thể hiện ở Bảng 2. Kết quả xác định LD50 của vi khuẩn *E. tarda* T5 trên lươn đồng giống là $4{,}6 \times 10^4$ CFU/mL. Lươn giống biểu hiện dấu hiệu bệnh lý chỉ sau 48 giờ cảm nhiễm vi khuẩn *E. tarda*. Những biểu hiện của lươn giống là tách đàn bơi ra khỏi giá thể,

giảm ăn, phần đầu và thân xuất hiện những đốm sưng và xuất huyết hậu môn cũng xuất huyết và lồi (Hình 3). Những dấu hiệu bên trong và bên ngoài tương tự như những dấu hiệu bệnh lý của những mẫu lươn bệnh được thu ở các hộ nuôi ban đầu.

Bảng 2: Kết quả xác định LD50 của vi khuẩn *E. tarda* T5

Mật độ (CFU/mL)	Tỷ lệ sống trung bình (%)
10^7	70,00±10,00
10^6	66,67±5,78
10^5	53,33±11,55
10^4	43,33±11,55
LD50	**$4,6x10^4$ CFU/mL**

Kết quả LD50 của vi khuẩn *E.tarda* T5 là $4,6x10^4$ CFU/mL cho thấy nồng độ gây chết này cũng tương đương với một số chủng khác của *Edwardsiella* như *E. ictaluri* với LD50 là $5,5x10^5$ CFU/mL trên cá nheo Mỹ (Wise và Terhune, 2001); vi khuẩn *Edwardsiella anguillarum* trên cá chình Mỹ (*Anguilla rostrata*) với LD50 là $2,5×10^5$ CFU/g (Yue Wang và cs., 2023). Trong khí đó, nồng độ LD50 của vi khuẩn *E. tarda* trên một số đối tượng khác như cá tra giống ở Indonesia và cá chình Trung Quốc lại cao hơn LD50 trong nghiên cứu này tương ứng lần lượt là 10^7 CFU/mL và $1,3x10^6$ CFU/mL (Sefti Heza Dwinanti và cs., 2023; Mo, ZQ. và cs., 2015). Tương tự, kết quả nghiên cứu của Ahmed H. Sherif và cs. (2020) cũng xác định LD50 của *E. tarda* là $2,5x10^6$ CFU/mL. Ngoài ra, một số nghiên cứu khác về LD50 của vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* gây bệnh trên trên lươn đồng cũng có giá trị LD50 cao hơn so với kết quả nghiên cứu này ở liều gây chết 10^7 CFU/mL và 2,84 x 10^6 CFU/g (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Đức Hiền, 2012; Shen Jin-yu, 2001).



Hình 3: Dấu hiệu bệnh lý của lươn giống sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *E. tarda* T5

3.3 Kết quả xác định tác nhân gây bệnh trên lươn đồng giống.

Thí nghiệm thực hiện trong 7 ngày theo dõi sau khi ngâm cảm nhiễm vi khuẩn *E. tarda* T5 với LD50 là $4,6x10^4$ CFU/mL. Kết quả cho thấy rằng nghiệm thức có ngâm cảm nhiễm vi khuẩn sau 48 giờ lươn có biểu hiện tách đàn, tách giá thể, hoạt động lờ đờ, sau 4 ngày xuất hiện các đốm xuất huyết ở mặt bụng thậm chí có lươn bị loét lồi ruột và lồi hậu môn (Hình 4 B). Đặc biệt, nghiệm thức được ngâm cảm nhiễm vi khuẩn bị nhiễm bệnh hoàn toàn và tỉ lệ chết 100% sau 7 ngày theo dõi. Mẫu vi khuẩn được phân lập từ những mẫu lươn bệnh trong thí nghiệm có những dấu hiện bệnh lý, đặc điểm khuẩn lạc, thời gian phát triển trên môi trường TSA tương tự như

chủng vi khuẩn cảm nhiễm ban đầu. Đồng thời, kết quả tái định danh bằng phương pháp giải trình tự cũng định danh được vi khuẩn tương đồng 100% với chủng vi khuẩn *E. tarda* (Hình 4C). Từ kết quả này có thể kết luận rằng vi khuẩn *E. tarda* gây bệnh trên lươn đồng giống với những biểu hiện bệnh lý đặc biệt nghiêm trọng và tỉ lệ chết 100%. Như vậy, tác nhân vi khuẩn *E. tarda* có thể là tác nhân đáng được quan tâm nghiên cứu biện pháp phòng và trị bệnh trên lươn giống.

Trình tự Edwardsiella tarda strain AF19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (99.29% tương đồng)

C

Hình 4: A – Lươn giống khỏe để bố trí thí nghiệm; B – Dấu hiệu bệnh lý sau khi cảm nhiễm *E. tarda* T5; C – kết quả tái định danh vi khuẩn *E. tarda*

4. KẾT LUẬN VÀ KHUYẾN NGHỊ

4.1 Kết luận:

Kết quả phân lập những mẫu lươn bệnh có dấu hiệu bệnh lý như tách giá thể, hoạt động yếu, bỏ ăn, có nhiều đốm xuất huyết ở mặt bụng có đặc điểm khuẩn lạc màu kem và màu vàng nhạt.

Kết quả giải trình tự 15 chủng vi khuẩn định danh được 3 loài bao gồm Plesiomonas shigelloides và Staphylococcus pasteuri đều chiếm 13%. Trong khi đó, loài Edwardsiella tarda chiếm 73,33%.

Kết quả xác định LD50 của Edwardsiella tarda là 4,6x104 CFU/mL. Đồng thời kết quả tái định danh vi khuẩn cũng xác định được vi khuẩn Edwardsiella tarda gây bệnh trên lươn giống với những dấu hiệu bệnh lý tương đồng với biểu hiện bệnh lý lươn giống thu về ban đầu.

4.2. Khuyến nghị

Tiếp tục nghiên cứu về tác nhân gây bệnh trên lươn giống do Edwardsiella tarda gây ra ở giai đoạn thương phẩm. Đồng thời, nghiên cứu thử nghiệm các biện pháp phòng và trị bệnh hiệu quả bệnh này trên lươn giống.

LỜI CẢM TẠ

Tác giả và nhóm cộng sự chân thành cảm ơn Ban Giám Hiệu Nhà trường đã cấp kinh phí thực hiện đề tài và các đơn vị phòng ban đã hỗ trợ trong quá trình thực hiện cũng như nghiệm thu đề tài.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Quang Tề. 2006. Bệnh học thủy sản. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản 1.

Bùi Thị Bích Hằng và Nguyễn Thanh Phương, 2020. Ảnh hưởng của nhịp bổ sung inulin vào thức ăn lên đáp ứng miễn dịch cá tra (Pangasianodon hypophthalmus). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 56(2B): 100-109.

Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Đức Hiền. 2012. Phân lập và xác định khả năng gây bệnh xuất huyết trên Lươn đồng của vi khuẩn Aeromonas hydrophyla. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 2012:22c 173-182.

Đỗ Thị Thanh Dung, Võ Đình Quang, Phan Thị Phượng Trang. 2017. Phân lập và tuyển chọn Lactobacillus spp. kháng Vibrio parahaemolyticus gây hội chứng chết sớm trên tôm tại Sóc Trăng. *Tạp chí phát triển KH&CN, tập 20*, số T3-2017.

Huỳnh Trường Giang, Vũ Ngọc Út và Trương Quốc Phú. 2015. Sử dụng chiết suất β-glucan từ rong biển để tăng sức đề kháng của tôm biển: tổng quan. Kỷ yếu Hội nghị Khoa học thủy sản lần 4 Trường Đại học Cần Thơ: 103-113.

Nguyễn Hữu Thanh, Nguyễn Phú Thọ, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Trịnh Thị Lan, Nguyễn Hữu Yến Nhi, Lê Thị mai Trinh, Ngô Quốc Nam, Huỳnh Thị Hồng Phượng, Nguyễn Ngọc Ẩn, Võ Minh Sơn, Đoàn Thị Minh Nguyệt. 2021. Nghiên cứu xây dựng quy trình sản xuất prebiotic từ vi khuẩn lactic ứng dụng trong sản xuất thức ăn cho tôm nhằm hạn chế bệnh hoại tử gan tụy cấp (acute hepatopancreatic necrosis disease – AHND). Bộ Khoa học và Công nghệ.

Nguyễn Thị Kim Quyên. 2020. Khảo sát khía cạnh kỹ thuật và hiệu quả tài chính của mô hình sản xuất giống lươn đồng (Monopterus albus) ở tỉnh an giang. *Tạp Chí Khoa học Quốc tế AGU – 2020*, Vol. 25 (2), 21 – 27.

Nguyễn Thị Mỹ Hân và Bùi Thị Bích Hằng, 2018. Ảnh hưởng của inulin và fructooligosaccharides lên tăng trưởng, một số chỉ tiêu miễn dịch và khả năng kháng khuẩn của cá tra (Pangasianodon hypophthalmus). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2):125-134.

Nguyễn Thi Thu Hằng. 2012. Nghiên cứu các bệnh thường gặp ở Lươn đồng giai đoạnn giống và các biện pháp phồng trị. Đề tài khoa học và công nghệ. Trường Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Văn Thành và Nguyễn Ngọc Trai. 2012. Phân lập và tuyển chọn vi khuẩn Lactobacillus sp. có khả năng ức chế vi khuẩn gây bệnh gan thận mủ và đốm đỏ trên cá Tra. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ.* 2012:23a 224-234.

Quyết định Ban hành Kế hoạch hành động thực hiện Chiến lược phát triển thủy sản giai đoạn 2021 - 2030, tầm nhìn đến năm 2045 tỉnh An Giang. Số: 2495/QĐ-UBND, ngày 28 tháng 10 năm 2021 của Ủy ban Nhân dân tỉnh An Giang.

Từ Thanh Dung. 2008. Bài giảng bệnh vi khuẩn trên động vật thủy sản. Khoa Thủy Sản. Trường Đại Học Cần Thơ.

Chen Ming, Xian-Quan Chen, Li-Xia Tian, Yong-Jian Liu, Jin Niu. 2020. Enhanced intestinal health, immune responses and ammonia resistance in Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) fed dietary hydrolyzed yeast (Rhodotorula mucilaginosa) and Bacillus licheniformis. Aquaculture Reports 17 (2020) 100385. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100385.

Dwinanti SH, Utami NA, Tanbiyaskur, Rarassari MA, Prayogo S, Mukti RC.

Efficacy of autogenous formalin killed whole cells vaccine to against edwardsiellosis in striped catfish (Pangasionodon hypophthalmus). Veterinaria, 72(2), 192-198.

Giang, Huỳnh Trường, Ann-Chang Cheng, Chia-Chun Chi, Kuo-Hsun Chiu, Chun-Hung Liu. 2018. A synbiotic improves the immunity of white shrimp, Litopenaeus vannamei: Metabolomic analyses reveal compelling evidence. Fish and Shellfish Immunology. doi: 10.1016/j.fsi.2018.05.031.

Ibrahim Adeshina, Bilal Ahamad Paray, Eijaz Ahmed Bhat, Aishat D. Ibrahim, Lateef O. Tiamiyu. 2023. Stimulatory effect of dietary alpha-lipoic acid on growth performance, antioxidant capacity, liver enzymes, immunity and protection of African catfish, Clarias gariepinus (B.), Edwardsiella tarda infection. https://doi.org/10.1111/jpn.13876.

Jin Niua, Shi-Wei Xiea, Hao-Hang Fanga, Jia-Jun Xiea, Tian-Yu Guoa, Yan-Mei Zhanga, Zhen-Lu Liua, Shi-Yu Liaoa, Ju-Yun Heb, Li-Xia Tiana, Yong-Jian Liu. 2018. Dietary values of macroalgae Porphyra haitanensis in Litopenaeus vannamei under normal rearing and WSSV challenge conditions: Effect on growth, immune response and intestinal microbiota. Fish & Shellfish Immunology. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.06.010.

Khang Wen Goh, Zulhisyam Abdul Kari,corresponding author, Wendy Wee, Nik Nur Azwanida Zakaria, Mohammad Mijanur Rahman, Muhammad Anamul Kabir, Noor Khalidah Abdul Hamid, Albaris B. Tahiluddin, Ahmad Syazni Kamarudin, Guillermo Téllez–Isaías, and Lee Seong Weicorresponding author . 2023. Published online 2023 Jul 5. doi: 10.3389/fvets.2023.1149514.

Mo, ZQ., Zhou, L., Zhang, X. et al. Outbreak of Edwardsiella tarda infection in farm-cultured giant mottled eel Anguilla marmorata in China. Fish Sci 81, 899–905 (2015). https://doi.org/10.1007/s12562-015-0906-3.

Olga Haenen, Ineke Roozenburg, Michal Voorbergen, Steven van Beurden and Marc Engelsma., 2011. Eel disease problems in cultured and wild eels since 25 years. Eel diseases workshop, eafp Conference SPLIT, 15th Sept 2011.

Shen Jin－yu, Liu Wen, Qian Dong, 2001. Studies on the Pathogens of Haemorrhagic Disease of Monopterus albus. *Journal of Zhejiang Ocean University 2001-02*.

Wise, D.J. and J.S. Terhune. 2001. The Relationship Between Vaccine Dose and Efficacy in Channel Catfish Ictalurus puncatus Vaccinated as Fry with a live attenuated Strain of Edwardsiella ictalur (RE-33). *Journal of the word aquaculture Society, Vol. 32*, June, 2001.

Xu, T., & Zhang, X. H. (2014). Edwardsiella tarda: An intriguing problem in aquaculture. Aquaculture, 431, 129–135. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.12.001.

Yue Wang, Shaowei Zhai, Qijuan Wan, Ming Xu, Minxia Chen, Songlin Guo. 2023. Pathogenicity of Edwardsiella anguillarum to American eels (Anguilla rostrata) and RNA-seq analysis of host immune response to the E. anguillarum infection.

Zhang Jian, Yongjian Liu, Lixia Tian, Huijun Yang, Guiying Liang, Donghui Xu. 2012. Effects of dietary mannan oligosaccharide on growth performance, gut morphology and stress tolerance of juvenile Pacific white shrimp, Litopenaeus vannamei. Fish & Shellfish Immunology 33 (2012) 1027e1032. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.05.001.

Zhou Li, Huifeng Li, Jian G. Qin, Xiaodan Wang, Liqiao Chen, Chang Xu, Erchao Lia. 2020. Dietary prebiotic inulin benefits on growth performance, antioxidant capacity,

immune response and intestinal microbiota in Pacific white shrimp (Litopenaeus vannamei) at low salinity. Aquaculture 518 (2020) 734847. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734847.

Zhu Fei, 2020. A review on the application of herbal medicines in the disease control of aquatic animals. Aquaculture, 526 (2020): 735422.