

ĐẶC ĐIỂM SINH HÓA VÀ KIỂU ARN RIBOSOM CỦA VI KHUẨN AEROMONAS PHÂN LẬP TỪ BỆNH PHẨM THỦY SẢN NUÔI Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Đặng Thị Hoàng Oanh¹

ABSTRACT

Twenty bacterial isolates were isolated from diseased fish and shellfish together with 3 reference strains were examined phenotypically by biochemical characters and genotypically by ribotyping. Comparison based on 45 phenotypic characters by Euclidean distance with unweighted average linkage clustering (UPGMA) showed that these isolates mainly clustered in two groups. One group which consists of 14 isolates was equated with *Aeromonas hydrophila*. The remaining group comprising six isolates, did not establish any relationship with the included reference strains. Strains were also subjected to rRNA gene restriction pattern analysis (ribotyping), using *Sma*I as restriction enzyme. Twelve ribotypes were detected among studied isolates. Matrices of similarity coefficients between all possible pairs of strains were calculated and clustered according to the UPGMA as well. Similarity of ribotyping patterns between strains supported the phenotypic identification and performed its usefulness for the investigation of epidemiological relationship between studied strains.

Keywords: *Aeromonas*, fish disease, ribotyping, phenotyping, aquaculture, Mekong River Delta

Title: Biochemical characters and ribotyping profiles of *Aeromonas* bacteria isolated from diseased fishes in aquaculture in the Mekong River Delta, Vietnam

TÓM TẮT

Đặc điểm chỉ tiêu hình thái, sinh lý, sinh hoá và kiểu ARN ribosome của hai mươi chủng vi khuẩn phân lập từ bệnh phẩm thủy sản được xác định. Kết quả định danh bằng phương pháp phân tích cụm 45 chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng trên cùng với 3 chủng vi khuẩn chuẩn dựa vào khoảng cách Euclid-UPGMA cho thấy các chủng vi khuẩn nghiên cứu được phân thành hai nhóm chính. Một nhóm, gồm 14 chủng, được định danh là *Aeromonas hydrophila*. Nhóm còn lại gồm 6 chủng, không nhóm cùng với chủng nào trong số ba chủng chuẩn. Kiểu RNA ribosom của các chủng vi khuẩn được xác định bằng enzym giới hạn *Sma*I. Có 12 kiểu ARN ribosom được phát hiện và được so sánh bằng hệ số tương quan Pearson để tính phần trăm đồng dạng giữa các chủng cũng bằng phương pháp UPGMA. Kết quả phân tích kiểu ARN ribosom giúp khẳng định kết quả định danh, đồng thời cho thấy kiểu ARN ribosom có thể được sử dụng để nghiên cứu quan hệ dịch tễ của các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

Từ khóa: *Aeromonas*, bệnh cá, kiểu ribosom, đặc điểm sinh hóa, nuôi thủy sản

1 GIỚI THIỆU

Vi khuẩn *Aeromonas* là nhóm vi khuẩn có nguồn gốc từ các thủy vực và cũng là tác nhân gây bệnh phổ biến ở người và động vật (Khardori và Fainstein, 1988; Austin và Austin, 1999). Vi khuẩn *Aeromonas* có hai nhóm kiểu hình khác biệt nhau. Nhóm thứ nhất là nhóm ưa lạnh và không di động, phổ biến của nhóm này là *Aeromonas salmonicida*. Nhóm thứ hai là nhóm ưa nhiệt trung bình và có khả

¹Trung Tâm Quản lý Dịch bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ, Việt Nam

năng di động, phổ biến là *A. hydrophila*, *A. caviae* và *A. sobria* (Popoff, 1984). Giữa các nhóm vi khuẩn *Aeromonas* có kiểu gen khác nhau lại có đặc điểm sinh lý, sinh hoá rất giống nhau nên việc định danh dựa theo các chỉ tiêu sinh lý, sinh hoá truyền thống thường rất khó để phân biệt chúng (Laganowska *et al.*, 2004). Có khá nhiều loài *Aeromonas* được phân lập ở thủy sản khỏe, bệnh phẩm thủy sản, nước hay bùn đáy ao nuôi thủy sản (Sugita *et al.*, 1994; Esteve *et al.*, 1995; Huys *et al.*, 1996), tuy nhiên chỉ có một số ít loài được xác định là tác nhân gây bệnh chủ yếu ở thủy sản (Torres *et al.*, 1993; Esteve *et al.*, 1995). Người ta chia vi khuẩn *Aeromonas* gây bệnh ở thủy sản thành ba phức hệ nhóm loài chủ yếu là *A. hydrophila*, *A. caviae* và *A. sobria* (Janda, 2001; Ogara *et al.*, 1998; Austin và Austin, 1999).

Bên cạnh phương pháp định danh vi khuẩn bằng các phản ứng sinh hoá truyền thống, hiện nay có khá nhiều kỹ thuật phân tử được phát triển và ứng dụng cho việc định danh các loài thuộc nhóm *Aeromonas*. Phổ biến là các phương pháp như xác định kiểu ARN ribosom (ribotyping) hay xác định độ dài đa hình các đoạn giới hạn (restriction fragment length polymorphism-RFLP), phản ứng trùng hợp (PCR) 16S ADN ribosom, tính đa hình chiều dài những đoạn khuếch đại (amplified fragment length polymorphism-AFLP) và thể đa hình khuếch đại ngẫu nhiên (randomly amplified polymorphic DNA-RAPD) (Laganowska *et al.*, 2004).

Ở Việt Nam, đã có nhiều đợt dịch bệnh bùng nổ ở những hệ thống nuôi thủy sản gây thất thoát sản lượng nghiêm trọng (Dung *et al.*, 1997). Vi khuẩn giống *Aeromonas* đã được nhiều tác giả báo cáo là tác nhân gây bệnh ở thủy sản (Dung *et al.*, 1997; Bùi Quang Tề và Vũ Thị Tám, 2000, Hứa Thị Phương Liên 1998). Tuy nhiên hầu hết các tác nhân gây bệnh vi khuẩn đều được định danh bằng các đặc tính sinh lý, sinh hoá. Việc định danh tác nhân vi khuẩn gây bệnh ở thủy sản ứng dụng các kỹ thuật phân tử còn rất hiếm.

Phòng thí nghiệm bệnh học thủy sản, Khoa Thủy sản Đại học Cần Thơ phân lập được một số chủng vi khuẩn từ bệnh phẩm một số loài thủy sản nuôi ở vùng Đồng Bằng Sông Cửu Long. Các chủng vi khuẩn này được định danh bằng phương pháp sinh hoá truyền thống và bằng phương pháp RFLP nhằm mục đích cung cấp thông tin về mối quan hệ giữa đặc tính sinh lý, sinh hoá và kiểu ARN ribosom để làm cơ sở cho việc thiết lập các kỹ thuật chẩn đoán và nghiên cứu quan hệ dịch tễ của mầm bệnh vi khuẩn ở thủy sản.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Phương pháp thu mẫu bệnh phẩm và phân lập vi khuẩn

Các mẫu bệnh phẩm thủy sản được khử trùng bằng cồn 70° và giải phẫu bằng bộ tiểu phẫu vô trùng. Vi khuẩn được phân lập từ gan, thận hay tụy và cấy lên môi trường Tryptic Soy Agar (TSA, Difco) và sau đó là môi trường chọn lọc *Aeromonas* agar (Oxoid) có chứa ampicilin (theo hướng dẫn của nhà sản xuất). Đĩa agar được ủ 24 giờ ở 28°C. Các khuẩn lạc có màu vàng trên môi trường *Aeromonas* agar được chọn để xác định các đặc điểm sinh lý, sinh hoá và kiểu ribosom cùng với ba chủng chuẩn. Nguồn gốc các chủng vi khuẩn nghiên cứu

được trình bày ở Bảng 1. Các chủng vi khuẩn được trữ ở -80 °C trong môi trường nutrient broth (NB, Oxoid) có chứa 15% glycerol và 1% (w/v) NaCl.

2.2 Phương pháp xác định các chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hóa

Các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa được chọn để định danh vi *Aeromonas* được trình bày ở bảng 2. Hình dạng, kích thước và tính rỗng của vi khuẩn được xác định bằng phương pháp nhuộm Gram (Barrow & Feltham 1993). Tính di động của vi khuẩn được quan sát bằng cách nhỏ một giọt nước cất lên lam, trải đều lên lam một ít vi khuẩn, đẩy bằng lammela và quan sát bằng kính hiển vi ở vật kính 100X.

Bảng 1: Nguồn gốc các chủng vi khuẩn nghiên cứu (số 1-20) và vi khuẩn chuẩn (số 21-23)

TT Mã số chủng	Nguồn gốc phân lập	Kiểu ribosom ^(a)	Kết quả định danh
1 VN VI	<i>Rana tigrina</i> /gan	7	<i>A. hydrophila</i>
2 VN VII 2 L 57	<i>Pangasius bocourti</i> /gan	5	<i>A. hydrophila</i>
3 VN VII	<i>Rana tigrina</i> /Thận	7	<i>A. hydrophila</i>
4 VN H V	Cá trê lai bột	11	<i>Aeromonas sp.</i>
5 VN K 19	<i>Oxyeleotris marmoratus</i> /thận	9	<i>Aeromonas sp.</i>
6 VN M 11	<i>O. marmoratus</i> /Thận	6	<i>A. hydrophila</i>
7 VN V K 1	<i>O. marmoratus</i> /Thận	10	<i>Aeromonas sp.</i>
8 VN Tam 2 L	-	1	<i>A. hydrophila</i>
9 VN VI 1 K	<i>P. bocourti</i> /Thận	4	<i>A. hydrophila</i>
10 VN MHO 17	<i>P. monodon</i> /hậu ấu trùng	3	<i>A. hydrophila</i>
11 VN MHO 3	<i>P. monodon</i> /hậu ấu trùng	1	<i>A. hydrophila</i>
12 VN VI 6 L	<i>P. bocourti</i> /gan	4	<i>A. hydrophila</i>
13 VN VI 2 L 83	<i>P. bocourti</i> /gan	4	<i>A. hydrophila</i>
14 VN MHO 10	<i>P. monodon</i> /hậu ấu trùng	1	<i>A. hydrophila</i>
15 VN Thien 2 K 2c	<i>O. marmoratus</i> /Thận	1	<i>A. hydrophila</i>
16 VN VII 4 Sp	<i>O. marmoratus</i> /Tụy	8	<i>Aeromonas sp.</i>
17 VN Thien HK	<i>O. marmoratus</i> /Thận	12	<i>Aeromonas sp.</i>
18 VN Vui 3 L	-	8	<i>Aeromonas sp.</i>
19 VN VIII 1 Sp a	<i>P. bocourti</i> /Tụy	2	<i>A. hydrophila</i>
20 VN V 3 L	<i>P. bocourti</i> /gan	2	<i>A. hydrophila</i>
21 <i>A. hydrophyla</i> ATCC 7966	-	-	-
22 <i>A. sorbia</i> CIP 7433	-	-	-
23 <i>A. caviae</i> ATCC 15468	-	-	-

^(a) Kiểu Ribosom được đánh số từ 1-12; VN: Vietnam; ATCC: American Type Culture Collection; CIP: Collection of the Pasteur Institute, Paris, France.

Các đặc điểm sinh lý sinh hóa được xác định dựa theo cẩm nang của Cowan & Steels (Barrow và Feltham, 1993). Mỗi chỉ tiêu được xác định ba lần kết quả được ghi nhận là kết quả có ít nhất 2 lần lặp lại.

Các chỉ tiêu về hình thái, sinh lý và sinh hoá được mã hoá bằng số 0 tương ứng với kết quả âm tính và số 1 tương ứng với kết quả dương tính. Số liệu sau đó được sử dụng để xác định mức độ giống nhau giữa các chủng vi khuẩn phân lập và biểu hiện bằng sơ đồ quan hệ qua chương trình phân tích cụm (Priest & Austin 1993) sử

dụng phần mềm NCSS 97. Mức độ giống nhau giữa các chủng vi khuẩn được xác định bằng khoảng cách Euclid-UPGMA (Euclidean distance with unweighted average linkage).

2.3 Xác định kiểu ARN ribosom (ribotyping)

Ly trích ADN: ADN của vi khuẩn được ly trích theo phương pháp của Pedersen và Larsen (1993). Vi khuẩn được nuôi 16 giờ trong 10 ml veal infusion broth có chứa 1 % NaCl. Sau đó 1.5 ml dung dịch vi khuẩn được ly tâm 2 phút ở 13,000 vòng/phút, rút bỏ phần môi trường, trộn đều với 500 µl dung dịch TE (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA) trước khi cho 20 µl dung dịch 10 % SDS vào và ủ 30 phút ở 56 °C để làm vỡ tế bào vi khuẩn. Sau khi ủ xong, dung dịch được trộn đều với 250 µl ammonium acetate, pH 4.5, để 15 phút ở -20 °C trước khi hoà vào 700 µl phenol:chloroform:isoamylalcohol (tỉ lệ 25:24:1). Sau đó dung dịch được ly tâm 15 phút ở tốc độ 13,000 vòng/phút, phần trong phía trên sau khi ly tâm được chuyển sang ống eppendop mới trộn với 800 µl chloroform:isoamylalcohol (tỉ lệ 24:1) và ly tâm 15 phút ở vận tốc 13,000 vòng/phút. Phần trong phía trên lại được chuyển sang ống eppendop mới lần nữa để kết tủa ADN bằng 350 µl isopropanol. Hỗn hợp được để 30 phút ở -20 °C, ly tâm 15 phút với tốc độ 13,000 vòng/phút, hút bỏ phần dung dịch, rửa ADN bằng dung dịch 70 % ethanol, làm khô ở nhiệt độ phòng và hoà tan trong 10 µl dung dịch TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA). Hàm lượng ADN được đo bằng quang phổ kế ở bước sóng 260 nm.

Cắt ADN bằng enzym giới hạn: ADN ly trích từ vi khuẩn được cắt bằng enzym giới hạn *Sma*I. Phản ứng được thực hiện gồm các thành phần: ADN ly trích từ vi khuẩn, 5 µl 10X restriction enzyme buffer, 3 µl enzyme *Sma*I, thêm nước tinh khiết cho đạt dung tích 20 µl. Hỗn hợp được trộn đều, ly tâm nhanh và ủ 3 giờ ở 37 °C. Sau đó hỗn hợp được trộn với 10 µl dung dịch nạp mẫu (2 mM EDTA pH 8.0; 0.1 % bromophenol blue; 30 % glycerol) và chạy điện di 18 giờ ở 25V trên bản thạch (0.8 % agarose) bằng dung dịch đệm TAE (40 mM Tris, 40 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0).

Quá trình khử puria, biến tính và thấm chuyển: gel sau khi chạy điện di được ngâm 10 phút ở nhiệt độ phòng trong dung dịch khử puria 0.25 M HCl, rửa bằng nước cất và được xử lý 30 phút trong dung dịch 0.5 M NaOH và 1.5 M NaCl để làm biến tính ADN. Sau đó, ADN trên gel được chuyển qua màng nylon bằng máy thấm chuyển chân không và được để 30 phút ở 80 °C để cố định ADN trên màng.

Quá trình tiền lai và lai ADN trên màng: ADN trên màng nylon được thấm với 20 ml dung dịch tiền lai và giữ 1 giờ ở 56 °C, rồi lai qua đêm ở 56 °C trong dung dịch lai chứa mẫu dò có trình tự bổ sung với ARN ribosom 16S và 23S của vi khuẩn. Mẫu dò được đánh dấu bằng digoxigenin. Sau khi lai, màng được rửa nhiều lần với dung dịch rửa.

Phát hiện các vạch ADN: màng nylon được ngâm 30 phút trong 5 % dung dịch cản, rồi được ủ 30 phút trong 40 ml dung dịch ủ có chứa 8 µl phosphatase labelled anti-digoxigenin. Sau cùng các vạch ADN được phát hiện bằng dung dịch có chứa chất nền phát màu (90 µl nitrobluetetrazolium chloride-NBT và 66 µl 5-bromo-4-chloro-2-indolylphosphat toluidinium salt-BCIP trong 20 ml dung dịch nhuộm).

Xử lý thống kê: màng chứa các vạch ADN được xử lý bằng phần mềm GelCompar (Applied Maths, Bỉ). Tỉ số đồng dạng các vạch ADN của các chủng vi khuẩn được điểm số bằng hệ số tương quan Pearson. Mức độ đồng dạng kiểu ADN của từng cặp chủng vi khuẩn được tính bằng phương pháp phân tích cụm với UPGMA và biểu thị bằng sơ đồ quan hệ của các chủng vi khuẩn.

3 KẾT QUẢ

3.1 Đặc tính hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn nghiên cứu

Kết quả quan sát và phân tích các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá của các chủng vi khuẩn nghiên cứu được trình bày ở bảng 2. Sơ đồ quan hệ giữa các chủng vi khuẩn nghiên cứu và chủng chuẩn qua kết quả phân tích cụm 45 chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hoá được trình bày ở hình 1.

Toàn bộ hai mươi chủng vi khuẩn nghiên cứu có hình que, gram âm, có khả năng di động và tiêu huyết, nhưng không sinh sắc tố. Chúng cho phản ứng dương tính với oxidase, catalase, có khả năng lên men trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí. Tất cả đều cho phản ứng decarboxylase dương tính với arginine, có khả năng phát triển trên môi trường có chứa huyết động vật. Chúng phát triển tốt ở các nhiệt độ 20 °C, 30 °C và 37 °C. Chúng không sinh ureaza nhưng sinh gelatinaza và indol. Có khả năng thủy phân tween 80 nhưng cho phản ứng âm tính với alginase. Tất cả đều có khả năng tạo nitrit từ nitrat, phát triển tốt ở 0 % và 3 % NaCl nhưng không thể phát triển ở 6 % NaCl trở lên. Cả hai mươi chủng đều không thể mọc trên môi trường TCBS và kháng với hợp chất hợp chất 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine (O/129 150 µg). Chúng không có khả năng phát quang nhưng có thể sinh axit từ glycerol, manitol, trehalose và glucose.

Qua kết quả phân tích cụm, hai mươi chủng vi khuẩn nghiên cứu chia thành hai nhóm, trong đó một nhóm gồm 14 chủng nhóm với chủng vi khuẩn chuẩn *A. hydrophila* ATCC 7966 (Hình 1). Sáu chủng còn lại không nhóm cùng với chủng nào trong ba chủng chuẩn được so sánh nên được gọi là *Aeromonas sp.* (Hình 1 và Bảng 2).

Mười bốn chủng nhóm với chủng vi khuẩn *A. hydrophila* có sai khác với chủng chuẩn ở một số chỉ tiêu. Điển hình là 13/14 chủng cho phản ứng dương tính với lysine, âm tính với ornithine, không cho phản ứng VP dương tính, không sử dụng đường sucrose, sử dụng lactose và xylose. Toàn bộ 14 chủng không có khả năng sử dụng citrat, 2/14 chủng không sinh gas từ glucose, chỉ có 4/14 chủng có khả năng sinh amylaza.

Sáu chủng *Aeromonas sp.* có đặc tính sinh hoá biến động so với chủng chuẩn và các chủng được định danh là *A. hydrophila* ở các chỉ tiêu là khả năng sinh gas từ glucose, thủy phân aesculin, sử dụng citrat, sinh amylaza, mọc ở 6 % NaCl, sử dụng một số loại đường như cellobiose, galactose, sucrose, salicin và xylose.

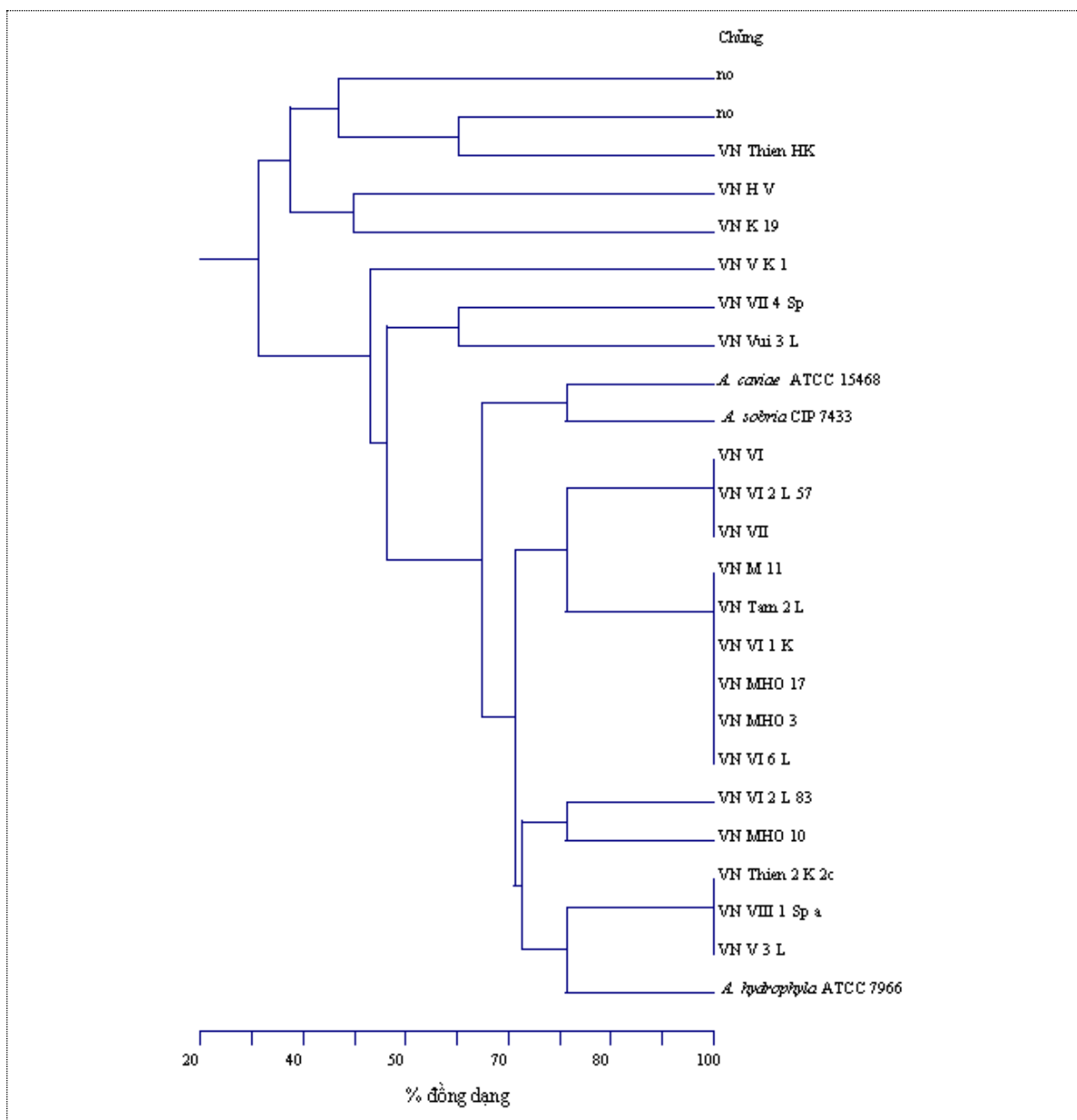
Bảng 2: Đặc điểm sinh lý, sinh hoá của các chủng vi khuẩn nghiên cứu và chủng chuẩn

Chỉ tiêu	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>A. caviae</i> ATCC 15468	<i>A. sobria</i> CIP 7433	<i>A. hydrophila</i> (*)	<i>Aeromonas sp.</i> (**)
Nhuộm Gram	âm	âm	âm	âm	âm
Hình dạng	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn	que ngắn
Tiêu tế bào máu	+	+	+	+	+
Sinh sắc tố	-	-	-	-	-
Di động	+	+	+	+	+
Sinh catalaza	+	+	+	+	+
Sinh oxidaza	+	+	+	+	+
Phản ứng lên men yếm khí	+	+	+	+	+
Phản ứng lên men hiếu khí	+	+	+	+	+
Arginine	+	-	-	+	+
Lysine	+	+	+	13	+
Ornithine	-	+	+	1	-
Mọc trên môi trường máu	+	+	+	+	+
Mọc ở 5 °C	+	+	+	+	+
Mọc ở 20 °C	+	+	+	+	+
Mọc ở 30 °C	+	+	+	+	+
Mọc ở 37 °C	+	+	+	+	+
Sinh gas từ glucose	+	-	+/-	12	5
Thủy phân aesculin	+	-	-	+	4
Sinh ureaza	-	-	-	-	-
Sử dụng citrate	+	-	+/-	+	5
Sinh amylaza	+	-	+/-	4	5
Sinh gelatinaza	+	-	+/-	+	+
Sinh indole	+	+	+	+	+
Phản ứng VP	+	-	-	13	+
Thủy phân tween 80	+	-	+/-	+	+
Sử dụng alginase	-	-	-	-	-
Tạo nitrit từ nitrat	+	+	+	+	+
Mọc ở 0 % NaCl	+	+	+	+	+
Mọc ở 3 %	+	+	+	+	+
Mọc ở 6 %	+	+	+	+	+
Mọc ở 7%	-	-	-	-	-
Mọc ở 10 %	-	-	-	-	-
Mọc trên thạch TCBS	-	-	-	-	-
Kháng với 0/129	-	-	-	-	-
Phát quang	-	-	-	-	-
Sử dụng					
Arabinose	+	+	+	1	-
Cellobiose	-	-	-	1	1
Galactose	+	+	+	+	5
Glycerol	+	-	+/-	+	+
Lactose	-	+	+	1	-
Mannitol	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	13	5
Glucose	+	+	+	+	+
Salicin	+	-	-	+	2
Xylose	-	+	+	1	1

(+): tất cả các chủng đều dương; (-): tất cả các chủng đều âm; (+/-): có thể dương tính hoặc âm tính; (chữ số): cho biết số các chủng dương

(*): các chủng VN VI; VN VI 2 L 57; VN VII; VN M 11; VN Tam 2 L; VN VI 1 K; VN MHO 17; VN MHO 3; VN VI 6 L; VN VI 2 L 83; VN MHO 10; VN Thien 2 K 2c; VN VIII 1 Sp a và VN V 3 L

(**): các chủng VN Thien HK; VN H V; VN K 19; VN V K 1; VN VII 4 Sp và VN Vui 3 L

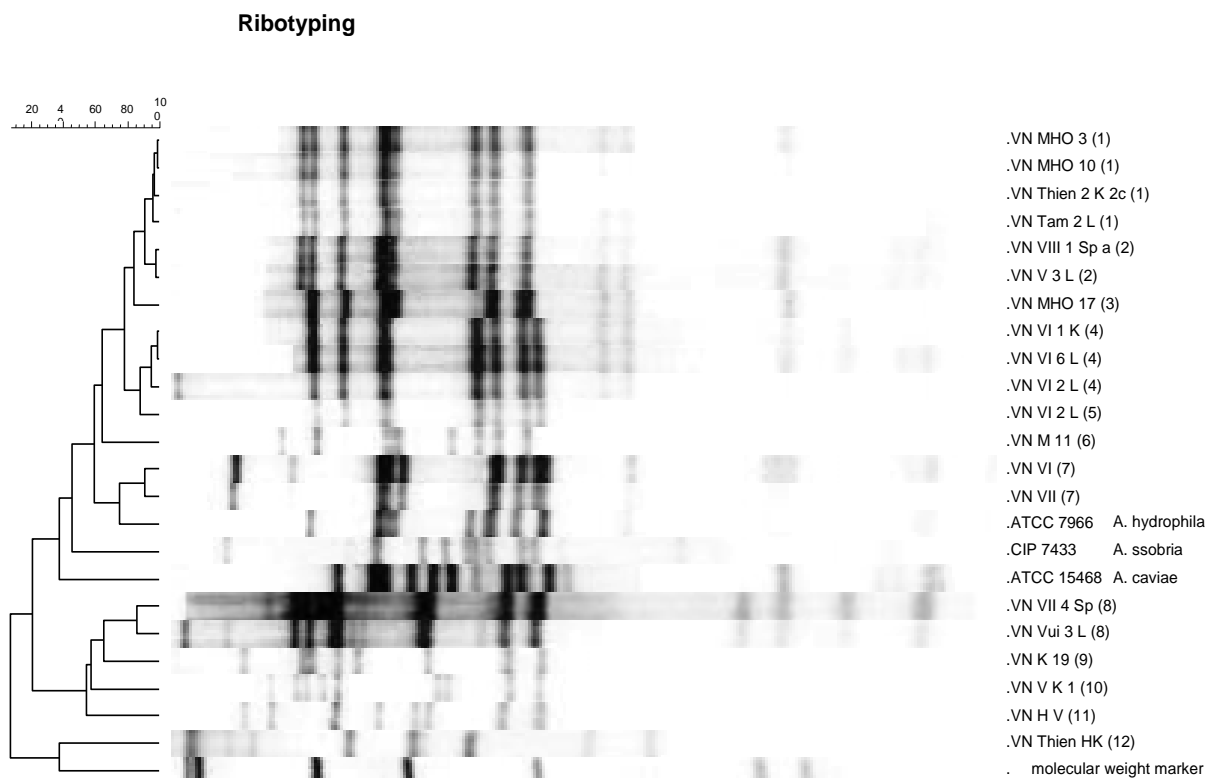


Hình 1: Sơ đồ quan hệ các chủng vi khuẩn phân tích với chủng chuẩn dựa trên các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hoá xác định bằng UPGMA sử dụng phần mềm NCSS 97

3.2 Kiểu ARN ribosom

Sơ đồ quan hệ của hai mươi chủng vi khuẩn nghiên cứu và chủng chuẩn dựa trên kiểu ARN ribosom được trình bày ở hình 2. Có 12 kiểu ribosom được phát hiện và được đánh số từ 1-12 (bảng 1 và hình 2). Mười bốn chủng vi khuẩn được định danh *A. hydrophila* từ các chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hóa có nhiều vạch ADN giống như chủng chuẩn và chia ra làm 7 kiểu ribosom trong khi nhóm *Aeromonas sp.* chia làm 5 kiểu ribosom. Phần lớn các chủng vi khuẩn có kiểu ARN ribosom riêng biệt. Bốn chủng VN MHO 3, VN MHO 10, VN Thien 2 K 2c và VN Tam 2 L có kiểu ribosom giống nhau (kiểu số 1). Các chủng VN VI 1K, VN VI 6L và VN VI 2 L cũng có kiểu ribosom giống hệt nhau (kiểu số 4). Các chủng còn lại đều có kiểu ribosom riêng biệt nhau. Kiểu ribosom 1 và 2 có tỉ số đồng dạng lớn hơn 90% nên được xem là tương tự nhau (hình 2).

Pearson correlation [0.0%-100.0%]



Hình 2: Sơ đồ quan hệ các chủng vi khuẩn nghiên cứu với chủng chuẩn dựa trên kiểu ribosom xác định bằng hệ số tương quan Pearson tính bằng UPGMA sử dụng phần mềm GelCompar. Molecular mass marker: Hind III-digested λ DNA

4 THẢO LUẬN

Hai mươi chủng vi khuẩn nghiên cứu có những đặc tính của giống vi khuẩn *Aeromonas* là Gram âm, hình que, di động, phản ứng oxidase và catalase dương tính, lên men glucose trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí, tạo nitrit từ nitrat, mọc trên môi trường thạch máu và kháng với hợp chất O/129 là hợp chất giúp phân biệt vi khuẩn thuộc giống *Vibrio* và *Aeromonas* (West *et al.*, 1986 và Popoff, 1984). Hơn nữa, chúng đều phát triển tốt ở môi trường có 6 % NaCl, ở nhiệt độ 20 và 30 °C. Chúng sinh indole và có khả năng tạo axit từ mannitol và trehalose.

Mười bốn chủng vi khuẩn *A. hydrophila* có 33/45 chỉ tiêu hình thái, sinh lý và sinh hoá giống chủng chuẩn *A. hydrophila* ATCC 7966 (bảng 2). Trong đó có các chỉ tiêu giúp phân biệt *A. hydrophila* với các vi khuẩn cùng và khác giống *Aeromonas*. Những chỉ tiêu điển hình giúp phân biệt vi khuẩn *A. hydrophila* và vi khuẩn *A. sobria* và *A. caviae* là cho phản ứng dương tính với arginine và lysine, có khả năng thủy phân aesculin, cho phản ứng VP dương tính và sinh gas từ glucose (Huy *et al.*, 1997; Abbott *et al.*, 2003). Toàn bộ 14 chủng được định danh là *A. hydrophila* đều có những đặc điểm này đồng thời có 12/14 chủng sinh gas từ glucose. Thêm vào đó, chúng còn có khả năng sử dụng citrate nhưng cho kết quả âm tính với cellobiose. Hai chỉ tiêu này giúp ích cho sự phân biệt *A. hydrophila* với *A. bestiarum* và *A. salmonicida* (Abbott *et al.*, 2003).

Nhóm *Aeromonas sp.* có những đặc tính sinh hóa khá đa dạng, không nhóm vào chủng nào trong 3 chủng chuẩn. Điều đáng lưu ý là các chủng này cho phản ứng dương tính với arginine và lysine nhưng âm tính với ornithine là những đặc tính của nhóm vi khuẩn *Aeromonas* bao gồm *A. hydrophila*, *A. veronii* bv sobria, *A. jandaei*, *A. schbertii*, *A. trota* và *A. allosaccharophia* (Abbott *et al.*, 2003). Tuy nhiên, chúng có nhiều chỉ tiêu cho kết quả biến đổi (bảng 2) trong đó có các chỉ tiêu giúp phân biệt các loài thuộc nhóm *Aeromonas* nói trên như khả năng thủy aesculin, phản ứng VP, khả năng sử dụng citrate, arebinosa, cellobiose và lactose. Các chủng vi khuẩn này sẽ rất hữu ích cho các nghiên cứu về vị trí phân loại nếu được so sánh với tất cả các chủng chuẩn đã được công bố thuộc giống *Aeromonas* (Popoff, 1984; Huy *et al.*, 1997).

Kiểu ARN ribosom đã được chứng minh là công cụ hữu hiệu để phân biệt các loài và các chủng cùng loài thuộc nhóm *Aeromonas* (Moyer *et al.*, 1992; Pedersen *et al.*, 1996). Mặc khác kiểu ribosom khác nhau giữa các chủng cùng loài có ý nghĩa quan trọng về mặt nghiên cứu dịch tễ của chúng. Moyer *et al.*, (1992) đã chứng minh các chủng vi khuẩn *Aeromonas* phân lập từ bệnh nhân và từ nguồn nước có kiểu ARN ribosom giống nhau. Điều này cũng được phát hiện trong số các chủng vi khuẩn nghiên cứu. Cụ thể là chủng VN MH 10 và VN Thien 2 K 2c có cùng kiểu ribosom số 1 nhưng chủng VN MH 10 được phân lập từ hậu ấu trùng tôm sú (*P. monodon*) còn chủng VN Thien 2 K 2c được phân lập từ thân cá bống tượng (*Oeleotris marmoratus*). Các chủng VN VI 1K, VN VI 6L và VN VI 2 L có kiểu ribosom số 4 thì được phân lập từ các cơ quan khác nhau của các mẫu bệnh phẩm cá basa (*P. bocourti*) khác nhau. Ngoài ra các chủng vi khuẩn có kiểu ribosom số 2 tương tự như kiểu số 1 cũng được phân lập từ bệnh phẩm cá basa. Các chủng vi khuẩn có kiểu ribosom giống nhau lại được phân lập từ mẫu bệnh phẩm có nguồn gốc khác nhau chứng tỏ có sự phát tán của chủng vi khuẩn đó trong hệ thống nuôi thủy sản.

5 KẾT LUẬN

Kết quả phân tích đặc điểm sinh hoá và kiểu ribosom cho thấy tính đa dạng về kiểu hình và kiểu di truyền của các chủng vi khuẩn *Aeromonas* nghiên cứu. Ngoài ứng dụng xác định kết quả định danh bằng phương pháp sinh hóa truyền thống, việc xác định kiểu ARN ribosom còn giúp phân biệt được những chủng vi khuẩn có kiểu gen giống nhau trong cùng loài cung cấp thông tin quan trọng cho việc thiết lập các kỹ thuật chẩn đoán và nghiên cứu quan hệ dịch tễ của mầm bệnh vi khuẩn *Aeromonas* ở thủy sản.

CẢM ƠN

Tác giả xin chân thành cảm sự giúp đỡ của Giáo sư Jens Laurits Laren và Bà Maj-Britt Højgård trong quá trình phân tích mẫu tại Phòng Thí Nghiệm bệnh cá, Bộ môn vi sinh Thú y, Đại học Nông nghiệp và Thú Y Hoàng Gia, Đan Mạch. Xin gửi lời cảm ơn đến Tiến sỹ Kerry Bartie, Viện Nghiên cứu thủy sản, Đại học Stirling, Anh Quốc đã giúp thực hiện gia phả ARN ribosom. Xin cảm ơn các cô Từ Thanh Dung, Trần Thị Tuyết Hoa và Nguyễn Thị Như ngọc, Khoa Thủy sản, Đại học Cần Thơ đã cung cấp các chủng vi khuẩn nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abbott, S. L., K. W. C. Wendy, and J. Michael Janda. 2003. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes. *J. of Clin. Micro.*, p. 2348–2357 Vol. 41, No. 6
- Austin, B. and D.A. Austin, 1999. *Bacterial Fish Pathogens*, 3th edn. Chichester.
- Barrow, G.I. & R.K.A. Feltham. 1993. *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bùi Quang tề và Vũ Thị Tám. 2000. Những bệnh thường gặp ở tôm cá và biện pháp phòng trị. Nhà xuất bản Nông Nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.
- Dung T.T., Z. Galina, D.T.H.Oanh, Z. Jeney and N.A. Tuan. 1997. Results of the baseline survey on fish health management in freshwater aquaculture of the Mekong Delta, Vietnam. WES newsletter No. 6.
- Esteve, C., C. Amaro, , *et al.* 1995. Pathogenicity of live bacteria and extracellular products of motile *Aeromonas* isolated from eels. *J. of App. Bact.* 78, 555–562.
- Huys, G., R. Coopman, P. Janssen and K. Kersters, 1996. Highresolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *Int. J. of Syst. Bact.* 46, 572–580.
- Huys, G., P. Kampfer, *et al.* 1997. *Aeromonas popoffii* sp.nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *Int. J. of Syst. Bact.* 47: 1165-1171.
- Hứa Thị Phượng Liên. 1998. Luận án Thạc Sĩ Ngành Nuôi Trồng Thủy Sản. Nghiên cứu bệnh xuất huyết trên vi, xoang miệng cá Basa (*Pangasius bocourti*) nuôi bè tại An Giang.
- Janda, J.M., Abbott, *et al.* 1996. Further studies on biochemical characteristics and serologic properties of the genus *Aeromonas*. *J. of Clin. Micro.* 34, 1930–1933.
- Khardori, N. and V. Fainstein, 1988. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as etiological agents. *Ann. Rev. of Micro.* 42, 395–419.
- Laganowska, M and A. Kaznowski, 2004. Restriction Fragment Length Polymorphism of 16S-23S rDNA Intergenic Spacer of *Aeromonas* spp. *Syst. and App. Micro.* 27, 549-557.
- Moyer, N.P., G. Martinetti, *et al.* 1992. Value of rRNA gene restriction patterns of *Aeromonas* spp. for epidemiological investigations. *Curr. Micro.*, 24, 15 21.
- Ogara, W.O., P. G. Mbutia, *et al.* 1998. Motile aeromonads associated with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) mortality in Kenya. *Bull. of the Euro. Assoc. of Fish Pathologists* 18, 7–9. 439–448.
- Priest, F. & B. Austin. 1993. *Modern Bacterial Taxonomy*, 2nd edn. Chapman & Hall.
- Pedersen, K., I. Dalsgaard, and J. L. Larsen, 1996. Characterization of atypical *Aeromonas salmonicida* isolates by ribotyping and plasmid profiling. *J. of App. Bact.*, 80, 37 44.
- Pedersen, K. & J.L. Larsen 1993. rRNA gene restriction patterns of *Vibrio anguillarum* serogroup O1. *Dis. of Aqua. Org.* 16: 121-126.
- Popoff, M. 1984. Genus III *Aeromonas*. In *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Vol. 1. ed. Krieg, N.R. and Holt, J.G. pp. 545–548. Baltimore.
- Torres, J.L., K. Tajima, and M. Shariff, 1993. Numerical taxonomy and virulence screening of *Aeromonas* spp. isolated from healthy and epizootic ulcerative syndrome-positive fishes. *Asian Fisheries Sciences* 6, 11–16.
- Sugita, H., T. Nakamura, *et al.* 1994. Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with the microplate hybridization method. *Appl. and Env. Micro.* 60, 3036–3038.
- West, P.A., P.R. Brayton, T.N. Bryant & R.R. Colwell. 1986. Numerical taxonomy of vibrios isolated from aquatic environments. *Int. J. of Syst. Bact.* 36 (4): 531-543