

XÁC ĐỊNH MỘT SỐ LOẠI VI SINH VẬT THƯỜNG GẶP Ở CÁ NƯỚC NGỌT NUÔI TRÊN ĐỊA BÀN THÀNH PHỐ HÀ NỘI

*Trần Thị Hương Giang, Đông Văn Hiếu, Mai Thị Ngân,
Huỳnh Thị Mỹ Lệ, Trịnh Đình Thâu
Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam*

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm xác định một số loài vi sinh vật thường gặp ở một số loài cá nuôi nước ngọt ở Hà Nội. Mẫu nước và cá khô được thu thập, phân tích, mổ khám và xác định các chỉ tiêu tổng số vi khuẩn hiếu khí, coliform bằng các phương pháp thường quy. Kết quả nghiên cứu cho thấy số lượng vi khuẩn nhiều nhất là ở ruột và mang cá, còn ở các cơ quan khác như da, gan, lách và cơ thì có số lượng vi khuẩn ít hơn. Có 8 loài vi khuẩn đã được xác định, bao gồm: *Salmonella spp*, *Pseudomonas spp*, *Aeromonas spp*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Proteus vulgaris* và *E.coli*. Số lượng và số loại vi khuẩn trong nước nhiều có thể là nguyên nhân ảnh hưởng tới hệ vi sinh vật trong các cơ quan, tổ chức cơ thể cá tại địa bàn nghiên cứu.

Từ khóa: Cá nước ngọt, Vi khuẩn, Thành phố Hà Nội

Identification of some common microorganisms in freshwater fish in Ha Noi City

*Tran Thi Huong Giang, Dong Van Hieu, Mai Thi Ngan,
Huynh Thi My Le, Trinh Dinh Thau*

SUMMARY

The objective of this study was to identify some common microorganisms in some freshwater culture fish in Ha Noi. Water and fish samples were collected, analyzed, dissected. The indexes of total aerobic bacteria, coliform were tested using the routine methods. The studied result indicated that the amount of bacteria on the individual organs was different. Most of bacteria species and numbers were in gut, gill of fish. In other organs such as skin, liver, spleen, and muscles, the species and amount of bacteria were lower. 8 species of bacteria were identified, including: *Salmonella spp*, *Pseudomonas spp*, *Aeromonas spp*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Proteus vulgaris* and *E.coli*. Bacteria in water may play a critical role that affect bacteria in the fish organs in the research area.

Keywords: Fresh water fish, Bacteria, Ha Noi City

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các loài cá nuôi nước ngọt như cá tra, cá basa, cá rô phi, cá diêu hồng (cá rô phi đỏ) đã trở thành đối tượng nuôi chính trong ngành nuôi cá nước ngọt đang ngày một phổ biến trên địa bàn các tỉnh miền Bắc nước ta. Tuy nhiên, do phát triển một cách tự phát nên bệnh truyền nhiễm vẫn thường bộc phát trong quá trình nuôi, sản lượng thu được không cao. Một số bệnh

nhiễm khuẩn thường gặp trên các đối tượng này như: lở loét, đốm đỏ, đốm trắng, hoại tử và xuất huyết các vây hoặc một số bệnh do nấm đã ảnh hưởng không nhỏ đến sản lượng và năng suất thu hoạch.

Vi khuẩn là một trong những tác nhân gây bệnh khá quan trọng, là trở lực chủ yếu kìm hãm phát triển và mở rộng sản xuất trong nuôi trồng thủy sản. Hầu hết các vi khuẩn gây bệnh

là một phần của hệ vi sinh vật bình thường trong môi trường nước và nói chung các vi khuẩn này được xem là tác nhân gây bệnh thứ cấp hoặc tác nhân gây bệnh cơ hội. Bệnh xảy ra thường là do biến động các yếu tố môi trường hoặc do stress, nhưng cũng có thể gây chết cao. Mục đích của nghiên cứu này nhằm cung cấp một cách nhìn tổng quát về tình hình nhiễm một số loại vi sinh vật thường gặp ở một số loài cá nước ngọt nuôi trên địa bàn thành phố Hà Nội, làm cơ sở cho công tác chẩn đoán và phòng bệnh trong nuôi cá nước ngọt.

II. NỘI DUNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

- Xác định tỷ lệ nhiễm, phân lập một số vi khuẩn thường gặp ở cá nước ngọt.
- Giám định đặc tính sinh học của một số vi khuẩn phân lập được.

2.2. Vật liệu

- Mẫu nước được thu thập từ một số ao, hồ theo ISO 5667-4: 1987
- Mẫu cá được thu thập từ các ao, hồ và chợ trên địa bàn thành phố Hà Nội
- Các dụng cụ, hóa chất dùng chẩn đoán vi trùng: Môi trường nuôi cấy phân lập, môi trường thử phản ứng sinh hóa, các loại thuốc thử.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1 Chuẩn bị mẫu

0,1 ml mẫu nước được pha loãng với 0,9 ml nước muối sinh lý 0,9%. Mẫu sau đó được tiếp tục pha loãng ở các độ pha loãng tiếp theo 10^{-2} , 10^{-3} , ... 10^{-8} .

1 gram mẫu mỗi loại tổ chức của cá được trộn với 9 ml 0,9% nước muối sinh lý. Hỗn dịch được đồng nhất trong máy đập mẫu stomacher (Seward, Vương quốc Anh) 230 vòng/phút trong 2 phút. Pha loãng với nước muối sinh lý ở các độ pha loãng 10^{-2} , 10^{-3} ... 10^{-8} .

2.3.2 Phương pháp phân lập vi khuẩn

0,1 ml mẫu ở hai độ pha loãng liên tiếp từ mẫu đã được chuẩn bị được cấy lán trên môi trường thạch plate count agar (PCA) và được ủ ở điều kiện 37°C trong 24 giờ. Kiểm tra hình thái vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm Gram, và đặc tính sinh hóa của vi khuẩn.

Số lượng vi khuẩn trong 1 gram mẫu được tính theo phương pháp Koch:

$$N (\text{CFU/g}) = 1/2 (10.a.10^n + 10.b.10^{n+1})$$

CFU (Colony Forming Unit): Tổng số khuẩn lạc trong một gram mẫu

a: số khuẩn lạc ở độ pha loãng 10^{-n}

b: Số khuẩn lạc ở độ pha loãng $10^{-(n+1)}$

2.3.3 Phương pháp xác định coliforms

Tiến hành định lượng coliforms theo phương pháp đếm khuẩn lạc theo TCVN 4883:1993. 0,1 ml mẫu đã được pha loãng được chọn từ hai độ pha loãng liên tiếp được cấy lán trên môi trường Brilliant Green Bile Salt Lactose và được ủ ở 37°C trong 48h. Coliforms được hiểu là những vi sinh vật sinh hơi trong môi trường nuôi. Kết quả được biểu thị bằng số coliforms trên 1g thịt hoặc 1 ml mẫu chưa pha loãng.

Số lượng coliforms trong 1 gram mẫu được tính theo công thức

$$A (\text{CFU/g}) = 1/2 (10.a.10^n + 10.b.10^{n+1})$$

CFU (Colony Forming Unit): Tổng số khuẩn lạc trong một gram mẫu

a: Số khuẩn lạc ở độ pha loãng 10^{-n}

b: Số khuẩn lạc ở độ pha loãng $10^{-(n+1)}$

2.3.4 Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu thập được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học, bằng phần mềm Excel 2007 và Minitab 16.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định vi khuẩn hiếu khí và coliform trong nước

Kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Số lượng vi khuẩn hiếu khí và coliform trong nước

Chỉ tiêu	Số mẫu kiểm tra (n)	Biến động số loại vi khuẩn	Số lượng (vk/ml) x 10 ²	
			\bar{X}_{tb} *	Khoảng tin cậy 95% (95% CI)
Vi khuẩn hiếu khí	15	2-8	4891	3406-6375
Coliform	15	1-2	156	112-200

* Giá trị trung bình mẫu

Số lượng vi khuẩn hiếu khí và tổng số coliform lần lượt là 4891 x 10² vk/ml và 156.10² vk/ml với số loại vi khuẩn dao động từ 2-8. Lương Đức Phẩm (2000) đã chỉ ra rằng các loài vi sinh vật gây bệnh xâm nhập vào cơ thể thông qua nguồn nước. Chúng không tồn tại được trong thời gian dài nhưng nước thải lại liên tục đổ vào, do vậy mà chúng có mặt thường xuyên trong nước. Nghiên cứu hiện tại chỉ ra rằng số loại vi

khuẩn đa dạng cộng với số lượng vi khuẩn nhiều có ảnh hưởng lớn đến sức khỏe của cá, đặc biệt là khi sức đề kháng của cá giảm.

3.2. Xác định một số vi khuẩn thường gặp trong tổ chức cá trôi, cá rô phi, cá mè

3.2.1. Kết quả xác định vi khuẩn hiếu khí trong tổ chức của cá

Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả xác định số lượng và số loài vi khuẩn tổng số ở các cơ quan một số loại cá nước ngọt phổ biến

Cơ quan	Số mẫu kiểm tra (n)	Cá rô phi			Cá trôi			Cá mè		
		Vi khuẩn tổng số (vk/g) x 10 ²			Vi khuẩn tổng số (vk/g) x 10 ²			Vi khuẩn tổng số (vk/g) x 10 ²		
		Biến động số loại vi khuẩn	\bar{X}_{tb}	Khoảng tin cậy 95% (95% CI)	Biến động số loại vi khuẩn	\bar{X}_{tb}	Khoảng tin cậy 95% (95% CI)	Biến động số loại vi khuẩn	\bar{X}_{tb}	Khoảng tin cậy 95% (95% CI)
Cơ	15	1-3	21,8	16,2-27,4	1-5	10,2	5,8-14,6	1-3	4,31	2,52-6,11
Gan	15	2-4	496	376-618	2-3	2130	1416-2845	1-4	430	211-649
Lách	15	1-3	371	212-529	1-3	895	441-1349	1-3	356	263-448
Mang	15	1-7	2733	2273-3191	2-6	35000	10717-59283	3-6	60656	39164-82147
Da	15	1-5	4154	3757-4551	3-4	1920	1188-2652	2-5	49806	30392-69220
Ruột	15	2-6	282250	158365-406135	1-5	22120	12434-31806	4-7	714280	611860-816700

Ở cá rô phi: số lượng vi khuẩn ở ruột là cao nhất là 282250x10² vk/g, với 95% CI là

158365x10²-406135x10² và số lượng vi khuẩn ít nhất ở cơ là 21,8x10² vk/g mẫu và 95% CI

là $16,2 \times 10^2 - 27,4 \times 10^2$. 8 loại vi khuẩn hiếu khí được ghi nhận có mặt ở các cơ quan, tổ chức của cá rô phi. Trong đó số loại vi khuẩn nhiều nhất là ở ruột (dao động từ 2-6 loại vi khuẩn), ở mang (1-7), ở da (1-5), ở gan (2-4), ở lách (1-3) loại và ít nhất là ở cơ, dao động từ 1-3 loại vi khuẩn..

Ở cá trôi: Có 6 loại vi khuẩn được ghi nhận tồn tại ở các cơ quan, tổ chức như cao nhất là ở mang (35000×10^2 vk/g, và 95% CI là $10717 \times 10^2 - 59283 \times 10^2$); ở ruột là (22120×10^2 vk/g). Ở lách ghi nhận số lượng vi khuẩn thấp nhất (895×10^2

vk/g, $441 \times 10^2 - 1349 \times 10^2$). Số loại vi khuẩn lớn nhất ở mang (2- 6) và ít nhất là ở lách (1-3).

Ở cá mè: Ruột là tổ chức có số lượng vi khuẩn lớn nhất là 714280×10^2 vk/g mẫu, ít nhất ở lách là 356×10^2 vk/g mẫu. Ở ruột cũng có số loại vi khuẩn là lớn nhất (4-7). Số loại vi khuẩn ít nhất ở cơ, dao động từ 1-3 loại vi khuẩn.

3.2.2. Kết quả xác định coliform trong tổ chức của cá

Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. Kết quả xác định số lượng và số loài Coliform ở các cơ quan một số loài cá nước ngọt phổ biến

Cơ quan	Số mẫu kiểm tra (n)	Cá rô phi			Cá trôi			Cá mè		
		Coliform (CFU/g) x 10 ²			Coliform (CFU/g) x 10 ²			Coliform (CFU/g) x 10 ²		
		Biến động số loại vi khuẩn	\bar{X}_{tb}	Khoảng tin cậy 95% (95% CI)	Biến động số loại vi khuẩn	\bar{X}_{tb}	Khoảng tin cậy 95% (95% CI)	Biến động số loại vi khuẩn	\bar{X}_{tb}	Khoảng tin cậy 95% (95% CI)
Cơ	15	0-2	1,81	0,6-3	0-2	1,6	0,9-2,3	0-1	1,98	0,82-3,1
Gan	15	0-4	92,4	52,32-133	0-2	36,2	25,4-47,04	0-2	153	95-211
Lách	15	0-3	20	6,74-32,19	0-2	16,7	8,4-25,02	0-2	107	59-156
Mang	15	0-5	2976	1127-5825	2-4	2521	1993-3049	2-4	828	671-985
Da	15	2-4	294	239-351	1-4	24,4	16-32,8	2-4	517	336-698
Ruột	15	1-5	14485	8458-20513	1-5	2197	1678-2716	2-5	7999	6441-9556

Ở cá rô phi: Các cơ quan được kiểm tra đều ghi nhận sự có mặt của coliform. Số lượng coliform lớn nhất ở ruột là 14485×10^2 CFU/g mẫu với 95% CI là $8458 \times 10^2 - 20513 \times 10^2$ và ít nhất ở cơ là $1,81 \times 10^2$ CFU/g mẫu với 95% CI là $0,62 \times 10^2 - 3 \times 10^2$. Số loại coliform được ghi nhận lớn nhất ở ruột (1-5 loại) và da (2-4 loại), ít nhất ở cơ (0-2 loại).

Ở cá trôi: số lượng vi khuẩn nhóm coliform

được tìm thấy nhiều nhất ở mang là 2521×10^2 CFU/g mẫu với 95% CI là $1993 \times 10^2 - 3049 \times 10^2$; sau đó là ruột, gan, da, lách và cuối cùng là cơ. Số lượng vi khuẩn trên cơ chỉ có $1,6 \times 10^2$ CFU/g mẫu với 95% CI là $0,9 \times 10^2 - 2,3 \times 10^2$. Số loại vi khuẩn ở ruột là lớn nhất (1-5), sau đó là đến mang, da, gan, cơ và thấp nhất là ở lách (0-2).

Ở cá mè: Ruột là tổ chức có số lượng vi khuẩn lớn nhất là 714280×10^2 vk/g và số loại vi

khuẩn nhiều nhất (4-7), ít nhất ở lách là 356×10^2 vk/g.

Nghiên cứu của Kim Văn Vạn và cs. (2000) chỉ ra rằng trong cơ quan của cá khỏe mạnh luôn thấy sự có mặt của vi khuẩn. Kết quả của chúng tôi chỉ ra rằng ở cơ quan của cá rô phi khỏe ghi nhận 8 loại vi khuẩn hiếu khí, ruột là cơ quan có số loại vi khuẩn hiếu khí nhiều nhất. Có thể lý giải điều này là do cá rô phi là loài ăn tạp,

thức ăn chủ yếu là các sinh vật thủy sinh lơ lửng trong nước, chúng có thể sống cả ở những nơi có hàm lượng oxi thấp và chúng sinh trưởng phát triển tốt trong điều kiện có độ ẩm nóng. Vì vậy, hệ vi sinh vật ở cá rô phi sẽ phong phú hơn ở các loài cá khác.

3.3. Kết quả giám định một số đặc tính sinh hóa của vi khuẩn phân lập được

Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả giám định một số vi khuẩn phân lập được từ cá

Vi khuẩn	Gram	Nuôi cấy		Các phản ứng sinh hóa										
		Mac conkey	Thạch thường	Glucoza	Lactoza	Galactoza	Saccharoza	Manit	VP	MR	Indol	H ₂ S	Urê	Citrat
<i>Salmonella spp</i>	-	Trong	Trắng đục	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	Trắng ngà	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>Aeromonas spp</i>	-	Vàng nhạt	Trắng ngà	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas spp</i>	-	-	Nâu nhạt	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>Staphylococcus spp</i>	+	-	Vàng thẫm	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Streptococcus spp</i>	+	-	Hơi xám	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	Hơi trong	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>E.coli</i>	-	Hồng đậm	Trắng tro	+	+	+	+(-)	+	-	+	+	-	-	-

Chú thích: (-) Phản ứng âm tính; (+) Phản ứng dương tính; VP: Voges - Proskauer; MR: Methyl - red

Dựa vào đặc điểm của nhóm vi khuẩn phân lập được và dựa vào bảng phân loại vi khuẩn của Millar và cs. (1993), hệ thống phân loại của Bergey và J.Plumb, chúng tôi đã bước đầu xác định được 8 loài vi khuẩn phân lập được gồm có: *Aeromonas spp*, *Pseudomonas spp*, *Salmonella spp*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* và *E.coli*.

Theo Bùi Quang Tề và cs (1996-1998), ở nước ao, bùn, và trong cơ thể cá luôn tồn tại các loài vi khuẩn như *Aeromonas*, *Pseudomonas*, chúng là những vi khuẩn cơ hội, khi sức đề kháng của cá kém, chúng sẽ gây bệnh cho cá. Cũng có nhiều vi sinh vật có mặt trong cơ thể cá không có ý nghĩa chức năng mà chỉ là những "bạn đường ngẫu nhiên" vào theo thức ăn và nước uống. Sự xuất hiện của những loài vi khuẩn này với số lượng và tính đa dạng của nó phụ thuộc vào độ ô nhiễm của môi trường sống và sự có mặt của chúng trong nguồn thức ăn, nước uống. Các nghiên cứu trước đây cũng khẳng định rằng ở cơ thể cá khỏe luôn tồn tại các loài vi khuẩn như *Pseudomonas*, *Proteus*, *Liquefaciens* (Lê Xuân Phương, 2001), *Aeromonas spp*, *Streptococcus spp* (Kim Văn Vạn, 2000).

IV. KẾT LUẬN

- Số loại vi khuẩn đa dạng cộng với số lượng vi khuẩn trong nước ở các ao nuôi nhiều cá.

- Số lượng vi khuẩn và coliforms trên những cơ quan tổ chức của cá là khác nhau, nhiều nhất là ở ruột và mang rồi đến da, gan, và thấp nhất ở lách và cơ.

- Có 8 loài vi khuẩn thường gặp trên các cơ

quan, tổ chức của cá và ao nuôi cá nước ngọt, bao gồm: *Salmonella spp*, *Pseudomonas spp*, *Aeromonas spp*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus spp*, *Streptococcus spp*, *Proteus vulgaris* và *E.coli*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Xuân Phương (2001). Vi sinh vật công nghiệp, NXB Xây dựng.
2. Lương Đức Phẩm (2000). Vi sinh vật học và an toàn vệ sinh thực phẩm, NXB Nông nghiệp, Hà Nội.
3. Bùi Quang Tề và cs (1996-1998). Chẩn đoán và phòng trị một số bệnh thường gặp ở cá nuôi và thủy hải sản. Tài liệu của Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản.
4. Hatai K. and S. Egusa (1979). Studies on the pathogenic fungus of mycotic granulomatosis-III. Development of the medium for MG-fungus. Fish Pathology, 13:147-152.
5. Mariperson (1998). Diseases in Asian Aquaculture, fish health section, Asian Fisheries Society, Bangkok, Thai Land.
6. Kim Văn Vạn và cs (2000). Kết quả kiểm tra sự nhiễm khuẩn trong một số tổ chức của cá trắm cỏ. Tuyển tập báo cáo khoa học năm 2000, Viện nghiên cứu NTTS 1.
7. Frerichs G.N and S.D. Millar (1995), Isolation and Identification of aquaculture bacterial pathogen, Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland. 2043. A waverly Company.
8. TCVN 4883: 1993
9. ISO 5667-4: 1987

Nhận ngày 15-5-2015

Phản biện ngày 20-10-2015