



PHÂN LẬP VI KHUẨN *Clostridium botulinum* TRÊN ỐC BUỒU (*Pila conica*) VÀ CUA ĐỒNG (*Somanniathelplusa sinensis*) TẠI THÀNH PHỐ CẦN THƠ, TỈNH AN GIANG VÀ KIÊN GIANG

Nguyễn Thu Tâm¹, Nguyễn Đức Hiền² và Hồ Thị Việt Thu¹

¹Khoa Nông nghiệp và Sinh học Ứng dụng, Trường Đại học Cần Thơ

²Chi cục Thú y thành phố Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 05/08/2016

Ngày chấp nhận: 25/10/2016

Title:

Isolation of *Clostridium botulinum* from edible snail and freshwater crab on farming land in Can Tho city, An Giang and Kien Giang provinces

Từ khóa:

Clostridium botulinum, phân lập và giám định, ốc, cua đồng, Cần Thơ, An Giang, Kiên Giang

Keywords:

Clostridium botulinum, isolation and identification, edible snail and freshwater crab, Can Tho, An Giang, Kien Giang

ABSTRACT

One hundred and thirty-five samples of edible snail (90) and freshwater crab (45) were collected from farming land in some districts of Can Tho city, Kien Giang and An Giang provinces from January to May 2016. All samples were cultured on cooked–meat medium and blood agar in anaerobic condition and then *Clostridium* spp was identified by Gram staining method combined with API 20A test. The results showed that *Clostridium* spp was isolated from (15.56%) 21/135 examined samples, in which these bacteria were isolated from 17/90 freshwater snails (18.89%) and 4/45 rice field crabs (8.89%). The percentage of *Clostridium botulinum* isolated from freshwater snails and rice field crabs was 2.22% (2/90) and 4.44% (2/45), respectively. The result of antibiotic sensitivity test of 21 clostridial isolates against 5 antibiotics including doxycycline, norfloxacin, marbofloxacin, florfenicol and fosfomycine showed that all of these bacterial isolates were fully sensitive (100%) to tested antibiotics.

TÓM TẮT

135 mẫu ốc bươu (90) và cua đồng (45) được lấy trên ruộng lúa tại một số huyện thuộc thành phố Cần Thơ, tỉnh Kiên Giang và tỉnh An Giang từ tháng 01 đến tháng 5 năm 2016. Mẫu được nuôi cấy phân lập trên môi trường cooked-meat medium và môi trường thạch máu trong điều kiện yếm khí và vi khuẩn *Clostridium* spp được định danh bằng phương pháp nhuộm Gram kết hợp với bộ phản ứng sinh hóa API 20A. Kết quả cho thấy, *Clostridium* spp phân lập được từ 15,56% số mẫu khảo sát (21/135). Trong đó, tỷ lệ vi khuẩn phân lập từ ốc bươu chiếm 18,89% (17/90) và từ cua đồng là 8,89% (4/45). Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *C. botulinum* trên ốc bươu là 2,22% (2/90) và trên cua đồng là 4,44% (2/45). Kết quả kiểm tra tính nhạy cảm của 21 mẫu vi khuẩn *Clostridium* spp phân lập được với 5 loại kháng sinh gồm doxycycline, norfloxacin, marbofloxacin, florfenicol và fosfomycine cho thấy các phân lập vi khuẩn này nhạy hoàn toàn (100%) với các kháng sinh thử nghiệm.

Trích dẫn: Nguyễn Thu Tâm, Nguyễn Đức Hiền và Hồ Thị Việt Thu, 2016. Phân lập vi khuẩn *Clostridium botulinum* trên ốc bươu (*Pila conica*) và cua đồng (*Somanniathelplusa sinensis*) tại thành phố Cần Thơ, tỉnh An Giang và Kiên Giang. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. Số chuyên đề: Nông nghiệp (Tập 2): 131-134.

1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Ốc bươu và cua đồng là hai loài động vật nước ngọt luôn hiện diện trên các cánh đồng, nhất là những cánh đồng ẩm ướt, có lượng nước lấp xấp. Ốc là đối tượng gây hại cho lúa và cua đồng là động vật sống ở tầng đáy, ưa nước sạch, hay đào hang thích nghi với đất sét, đất cát. Đây là hai loài động vật ruộng lúa làm cho người nông dân tốn nhiều chi phí và công lao động. Nhưng đây cũng là những loài động vật cung cấp thức ăn bổ sung đạm, khoáng cho con người và một số loài động vật khác, đặc biệt là vịt chạy đồng.

Trong những năm gần đây, biến đổi khí hậu diễn biến ngày càng phức tạp, thời tiết nóng lên, đặc biệt năm nay hạn hán kéo dài, tình hình xâm nhập mặn sâu vào nội địa xảy ra ở nhiều tỉnh Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Đây là một trong những nguyên nhân làm giảm sức đề kháng của nhiều loài cây trồng và vật nuôi, nhất là thủy cầm và đồng thời tạo những điều kiện thuận lợi cho nhiều loài vi khuẩn gây bệnh phát triển, trong đó có *Clostridium botulinum*.

Vi khuẩn *Clostridium botulinum* là trực khuẩn Gram dương, yếm khí, có khả năng sinh nha bào và sinh ngoại độc tố thần kinh gây chứng liệt cơ, liệt mí mắt, suy hô hấp dẫn đến chết cho người và động vật khi bị nhiễm độc tố (Hồ Thị Việt Thu và Nguyễn Đức Hiền, 2012). Vi khuẩn thường tồn tại rất lâu trong đất, một số nghiên cứu gần đây cho thấy đất ruộng cũng có sự hiện diện của *Clostridium botulinum* với tỷ lệ khá cao (20%) (Nguyễn Thu Tâm và ctv., 2015). Đây có thể là nguồn gây nhiễm vi khuẩn vào một số loài động vật nước ngọt như cua, ốc... từ đó có thể gây ngộ độc cho người và động vật, đặc biệt là vịt chạy đồng. Nhằm tìm xác định hiện diện của *Clostridium botulinum* trên cua, ốc, chúng tôi đã thực hiện nghiên cứu này.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu

Tủ lạnh, tủ sấy, autoclave, kính hiển vi, tủ ấm CO₂, Vortex.

Môi trường TSA (Tryptic Soy Agar, Merck), MHA (Mueller Hinton Agar, Merck), máu cừu (Công ty Nam Khoa), Cooked Meat (CM, Oxoid), Thioglycolate (Merck), bộ API 20A (Bio-Mérieux, Pháp).

Các đĩa kháng sinh: doxycycline, norfloxacin, marbofloxacin, florfenicol, fosfomycin (Bio-rad).

2.2 Mẫu và phương pháp lấy mẫu

Mẫu: cua đồng và ốc bươu trên các đồng ruộng đang chăn thả vịt chạy đồng thuộc một số địa phương của tỉnh Kiên Giang, An Giang và Cần Thơ.

– Phương pháp lấy mẫu

Đối với mẫu ốc: Mỗi mẫu được lấy ngẫu nhiên 3 - 5 con tại những vị trí khác nhau trên cùng một thửa ruộng. Ốc sẽ được bắt dọc theo các đường thoát nước của ruộng. Mẫu được chứa trong túi nilon vô trùng, vuốt và đáy không khí ra ngoài, dùng dây cột kín túi nilon lại, ghi kí hiệu, đặt vào thùng bảo quản lạnh sau đó đem về phòng thí nghiệm.

Đối với mẫu cua: Mỗi mẫu bắt ngẫu nhiên 1 con cua ở những thửa ruộng khác nhau. Cua phải được bẻ hết càng và chân cho vào túi nilon vô trùng, vuốt và đáy không khí ra ngoài, dùng dây cột kín túi nilon lại, ghi kí hiệu, đặt vào thùng bảo quản lạnh sau đó đem về phòng thí nghiệm.

2.3 Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp phân lập vi khuẩn *Clostridium spp.*:

Lấy que tâm vô trùng nhúng vào mẫu ốc hoặc cua (ốc thì tách khỏi vỏ hoặc cua tách mai và chỉ lấy nội tạng) cấy vào môi trường thạch máu, sau đó ủ trong điều kiện yếm khí (37°C trong 24h). Chọn những khuẩn lạc màu trắng đục, to, nhầy, bề mặt khô, không bóng, không tròn đều, có khả năng dung huyết, đường kính khoảng từ 0,5 – 1 cm. Nhuộm Gram, quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi với vật kính 100X để xem hình dạng, tính chất bắt màu, hình dạng nha bào, độ thuần nhất của vi khuẩn. Sau đó, kiểm tra đặc tính sinh hóa của vi khuẩn bằng bộ sinh hóa API 20A, giữ giống trên môi trường CMM (CDC, 1998).

Phương pháp kiểm tra sinh hóa của vi khuẩn bằng test API 20A:

+ Chuẩn bị canh trùng: Mở ống môi trường API 20A, dùng que cấy gạt lấy khuẩn lạc vi khuẩn đã thuần trên môi trường thạch máu, đồng nhất vi khuẩn sao cho đạt nồng độ lớn hơn hoặc tương đương ống 3 McFarland.

+ Chuẩn bị thanh API: Chuẩn bị một hộp ủ (bao gồm khay và nắp), thêm 5 ml nước muối sinh lý đã tiệt trùng vào các giếng honeycomb để tạo độ ẩm, đặt thanh API 20A vào khay ủ, sử dụng pipet vô trùng cho canh trùng đã chuẩn bị vào thanh API 20A, tránh tạo thành bọt khí và nghiêng thanh nhẹ nhàng về phía trước, với giếng GEL, phủ đầy cả ống; giếng IND, phủ vừa đủ ống và làm đầy phần

hình chén bằng dầu khoáng. Đậy nắp khay và ủ trong tủ ẩm CO₂ đọc kết quả sau 24 giờ.

+ Phương pháp kiểm tra độ nhạy của vi khuẩn với kháng sinh: Chuẩn bị canh trùng của vi khuẩn *Clostridium spp* thuần sao cho đạt nồng độ 10⁸ CFU/ml (bằng cách so độ đục với ống chuẩn Mc Farland 0,5). Dùng que tăm bông vô trùng nhúng vào canh trùng, ép vào thành ống nghiệm cho bớt

nước rồi ria đều khắp mặt thạch MHA. Dùng kẹp vô trùng đặt các đĩa kháng sinh đã chọn lên mặt thạch, các đĩa kháng sinh cách nhau 2,5 cm đến 3,5 cm và cách rìa đĩa thạch 2 cm. Đĩa được ủ trong tủ ẩm CO₂ ở nhiệt độ 37⁰C. Sau 24 giờ đo đường kính vòng vô khuẩn (mm), rồi đối chiếu với bảng tiêu chuẩn của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) năm 2014 để đánh giá.

Bảng 1: Bảng đường kính vòng vô khuẩn chuẩn của một số loại kháng sinh (CLSI, 2014)

STT	Kháng sinh	Hàm lượng (µ)	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)		
			Nhạy	Trung bình	kháng
1	Doxycycline	30	≥ 13	10 - 12	≤ 9
2	Marbofloxacin	5	≥ 18	15 - 17	≤ 15
3	Norfloxacin	10	≥ 17	13 - 16	≤ 12
4	Florfenicol	30	≥ 19	15 - 18	≤ 14
5	Fosfomycin	200	≥ 16	13 - 15	≤ 12

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel và Minitab 16,0 (Chi-square Yates)

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Kết quả phân lập vi khuẩn *Clostridium spp.* trên ốc và cua

Bảng 2: Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Clostridium spp.* trên ốc và cua

Mẫu	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ nhiễm (%)
Ốc	90	17	18,89
Cua	45	4	8,89
Tổng	135	21	15,56

(*p*=0.131)

Kết quả Bảng 2 cho thấy, trong 135 mẫu ốc và cua được kiểm tra có 21 mẫu dương tính với vi khuẩn *Clostridium spp.* chiếm tỷ lệ 15,56 %, trong đó ốc có 17/90 mẫu (18,89%) và cua có 4/35 mẫu (8,89%). Sự hiện diện của *Clostridium spp.* trên ốc và cua khá cao, có thể là do chúng bị vấy nhiễm vi khuẩn từ trong đất. Theo Wosbeser *et al.* (1987), vi khuẩn *Clostridium* thường xuyên hiện diện trong các vùng đất tràm tích, đầm lầy, ngập nước thường xuyên. Tuy nhiên, tỷ lệ nhiễm *Clostridium spp.* trên ốc và trên cua khác nhau không có ý nghĩa thống kê (*p*=0.131). Điều này có thể là do ốc và cua cùng sinh sống trong cùng môi trường (cùng mảnh ruộng) nên khả năng bị vấy nhiễm vi khuẩn là như nhau.

3.2 Kết quả phân lập vi khuẩn *Clostridium spp.* theo địa phương

Bảng 3: Tỷ lệ nhiễm vi khuẩn *Clostridium spp.* trên ốc và cua đồng theo địa điểm lấy mẫu

Loại Mẫu	An Giang			Cần Thơ			Kiên Giang		
	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)	Số mẫu kiểm tra	Số mẫu dương tính	Tỷ lệ (%)
Ốc	30	8	26,67	30	3	10,00	30	6	20,00
Cua	15	2	13,33	15	0	0,00	15	2	13,33
Tổng	45	10	22,22 ^a	45	3	,67 ^b	45	8	17,78 ^a

Các giá trị trong cùng 1 hàng có chữ mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa (*p*<0.05)

Theo kết quả trên, vi khuẩn *Clostridium spp.* Đã phân lập được trên 90 mẫu ốc và 45 mẫu cua ở 3 tỉnh. Tỷ lệ phân lập cao nhất được ghi nhận ở An Giang 22,22% (10/45), kế đến là Kiên Giang 17,78% (8/45) và thấp nhất là ở Cần Thơ 6,67% (3/45). Qua phân tích thống kê, tỷ lệ nhiễm *Clostridium spp.* trên ốc và cua tại An Giang và Cần Thơ khác nhau có ý nghĩa (*p*=0.036).

3.3 Kết quả xác định *Clostridium spp.* bằng phản ứng sinh hóa

Một số loài của vi khuẩn *Clostridium spp.* được xác định bằng phản ứng sinh hóa API 20A kết hợp với phương pháp nhuộm Gram và kết quả được thể hiện qua Bảng 4.

Bảng 4: Kết quả xác định loài vi khuẩn *Clostridium* spp. chủ yếu thông qua một số đặc tính sinh hóa

Loại Mẫu	<i>C. botulinum</i>			<i>C. colinum</i>		
	Số mẫu KT	Mẫu dương	Tỷ lệ (%)	Số mẫu KT	Mẫu dương	Tỷ lệ (%)
Ốc	90	2	2,22	90	13	14,44
Cua	45	2	4,44	45	2	4,44
Tổng	135	4	2,96 ^a	135	15	11,11 ^b

Các giá trị trong cùng 1 hàng có chữ mũ khác nhau thì khác nhau có ý nghĩa ($p < 0.05$);

Kết quả Bảng 4 cho thấy, *C. colinum* chiếm tỷ lệ cao nhất 11,11% (15/135), kế đến *C. botulinum* 2,96% (4/135). Tỷ lệ hiện diện của vi khuẩn *C. botulinum* và *C. colinum* phân lập được trên ốc và cua khác nhau có ý nghĩa ($p=0.003$). Bảng kết quả trên cho thấy sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium* spp. đặc biệt là *C. botulinum* là một cảnh báo nguy cơ xảy ra bệnh và ngộ độc thực

phẩm trên người và động vật khi ăn phải ốc và cua bị nhiễm độc tố của vi khuẩn *Clostridium*.

3.4 Kết quả kiểm tra độ nhạy cảm của vi khuẩn *Clostridium* spp. phân lập được với một số loại kháng sinh

Kết quả khảo sát tính nhạy cảm đối với kháng sinh vi khuẩn *Clostridium* spp. phân lập từ ốc và cua được trình bày ở Bảng 5.

Bảng 5: Kết quả kháng sinh đồ của vi khuẩn *Clostridium* spp phân lập được

STT	Kháng sinh	Số mẫu KT	Nhạy	Tỷ lệ (%)	TB	Tỷ lệ (%)	Kháng	Tỷ lệ (%)
1	Doxycycline	21	21	100	0	0	0	0
2	Marbofloxacin	21	21	100	0	0	0	0
3	Norfloxacin	21	21	100	0	0	0	0
4	Florfenicol	21	21	100	0	0	0	0
5	Fosfomycin	21	21	100	0	0	0	0

Kết quả Bảng 5 cho thấy, 100% (21/21) chủng vi khuẩn *Clostridium* spp phân lập được, trong đó chủ yếu là *C. colinum* và *C. botulinum*, nhạy cảm hoàn toàn với 5 loại kháng sinh: doxycycline, norfloxacin, marbofloxacin, florfenicol, fosfomycin. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Nguyễn Đức Hiền (2012), *C. botulinum* nhạy cảm hoàn toàn với norfloxacin, Cephalexin, fosfomicin, cetiofur, kháng với ampicillin và amoxicillin (80%). Có thể thấy những chủng vi khuẩn clostridia này tồn tại trong một môi trường tự nhiên cách biệt, cô lập với quần thể vi khuẩn khác cư trú trên người và các động vật nuôi, do vậy chưa bị lây nhiễm những gen đề kháng kháng sinh đang lưu hành khá phổ biến trong quần thể vi khuẩn ở khu vực ĐBSCL. Những thông tin về tính nhạy cảm và đề kháng đối với từng loài vi khuẩn *Clostridium* cụ thể là những số liệu hữu ích cho những người làm công tác điều trị.

4 KẾT LUẬN

Có sự hiện diện của vi khuẩn *Clostridium* spp. trên ốc và cua trên ruộng tại một số địa phương thuộc tỉnh An Giang, Kiên Giang và Cần Thơ với tỷ lệ khá cao, lần lượt là 18,89% và 8,89%. Bằng thử nghiệm API20, nghiên cứu đã xác định được sự hiện diện của 2 loài vi khuẩn *C. colinum* 11,11%, *C. botulinum* 2,96%. Vi khuẩn phân lập được nhạy cảm hoàn toàn với 5 loại kháng sinh: norfloxacin,

marbofloxacin, doxycycline, florfenicol, fosfomycine.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

CDC (1998). Botulism in United States, 1899–1996. Handbook for Epidemiologists, Clinical and Laboratory Workers. Centers for Diseases Control and Prevention:pp. 1-38.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), (2014). ‘Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth International Supplement. M100-S24, Vol 34 N1. CLSI, Wayne, Pennsylvania

Hồ Thị Việt Thu, Nguyễn Đức Hiền (2012). “Giáo trình Bệnh Truyền Nhiễm Gia Súc Gia Cầm”, NXB Đại học Cần Thơ

Nguyễn Đức Hiền (2012). “Phân lập và xác định tính nhạy cảm kháng sinh của vi khuẩn (*Clostridium botulinum*) từ vịt và môi trường chăn thả tại thành phố Cần Thơ”, Tạp chí khoa học 2012:22c, page 64-71.

Nguyễn Thu Tâm, Nguyễn Đức Hiền, Hồ Hồng Ngân (2015). “Phân lập và định danh vi khuẩn *Clostridium* spp. từ đất ruộng tại hai huyện Phú Tân và Châu Phú, tỉnh An Giang”. Kỷ yếu Hội nghị khoa học toàn quốc Chăn nuôi Thú y . 28-29/4/2015; Đại học Cần thơ.

Wobeser, G., Marsden, S., & MacFarlane, R. J., 1987. Occurrence of toxigenic *Clostridium botulinum* type C in the soil of wetlands in Saskatchewan. Journal of wildlife diseases, 23(1), 67- 76.