

ĐẶC ĐIỂM HÌNH THÁI VÀ TRÌNH TỰ GEN 16S rRNA CỦA VI KHUẨN TƯƠNG TỰ RICKETTSIA (RLB) Ở TÔM HÙM BÔNG (*PANULIRUS ORNATUS*) BỊ "BỆNH SỮA"

Nguyễn Chí Thuận, Phạm Ngọc Long, Nguyễn Quang Vinh, Nguyễn Thị Thanh Lợi

Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Một số bệnh do vi khuẩn tương tự Rickettsia (RLB) đã xảy ra ở động vật giáp xác như cua, tôm sú và gây thiệt hại đáng kể về kinh tế. Đặc biệt bệnh xảy ra nghiêm trọng trên tôm hùm nuôi ở Việt Nam năm 2007 và dịch bệnh xảy ra liên tục hàng năm từ khi phát hiện đến nay. Nghiên cứu này trình bày kết quả đặc điểm hình thái và trình tự gen 16S rRNA của RLB từ mẫu tôm hùm bông bị bệnh sữa (*Panulirus ornatus*) nuôi ở Việt Nam. Bệnh sữa là bệnh do hemolymph (máu) của tôm hùm chuyển sang dạng "bệnh sữa". Giả định về tác nhân gây bệnh là do một loại vi khuẩn gram âm không nuôi cấy trên các môi trường vi sinh truyền thống. Nghiên cứu hình thái qua chụp TEM, SEM và phân tích trình tự gen 16S rRNA từ các vi khuẩn gây bệnh sữa này đã chỉ ra chúng là một loài thuộc α -proteobacteria và thuộc bộ Rickettsia. Trình tự gen 16S rRNA đã được đăng kí trên Ngân hàng gen Quốc tế với mã số HQ130336; HQ130337. So sánh với nhiều trình tự trên Ngân hàng gen Quốc tế của gen 16S rRNA từ RLB nhiễm ở cua châu Âu (*C. maenas*), tôm sú (*P. monodon*) và tôm hùm (*Panulirus* spp.) bị bệnh sữa cho thấy các RLB có trình tự gen tương đồng cao.

Từ khóa: Bệnh sữa, gen 16S rRNA, kính hiển vi điện tử, vi khuẩn tương tự Rickettsia, tôm hùm

MỞ ĐẦU

Bệnh sữa ở tôm hùm bông (*Panulirus ornatus*) là bệnh nguy hiểm mới xuất hiện lần đầu tiên ở Việt Nam cuối năm 2006. Khánh Hòa là địa phương đầu tiên phát hiện bệnh sau đó lan rộng ra nhiều vùng nuôi tôm hùm khác. Hậu quả là gây chết hàng loạt tôm hùm thương phẩm và làm thiệt hại lớn về kinh tế. Chỉ tính đến cuối năm 2007 tổng thiệt hại do bệnh này gây ra khoảng 200 tỷ đồng, các năm tiếp theo bệnh thường xảy ra và gây thiệt hại và thất thoát 20-30% trong tổng số tôm nuôi. Bệnh có biểu hiện tương tự ở tôm hùm gai Florida key (*Panulirus argus*) với tác nhân được xác định do virus PaV1 (Shields, Behringer, 2004; Megan *et al.*, 2007). Một số loài ký sinh trùng đã gặp trong tôm bị bệnh sữa là: *Zoothamnium* spp. ký sinh ở mang và một số phần phụ chiếm tỷ lệ 9,5%; - *Nematoda* ở mang của tôm chiếm tỷ lệ 5,7%. Đặc biệt hai loại ký sinh trùng này đã gặp ở cả tôm bệnh và tôm khỏe. Nhiều tài liệu của thế giới cho rằng tôm hùm cũng có thể bị bệnh do ký sinh trùng thuộc ngành vi bào tử (*Microsporidia*) khiến cơ và các nội tạng khác chuyển sang màu trắng sữa (Yasunari *et al.*, 2009).

Ở Việt Nam các nghiên cứu bước đầu đã phát hiện thấy trong bệnh phẩm tôm hùm mắc bệnh sữa có vi khuẩn Gram âm, sống kí sinh nội bào bắt buộc giống với Rickettsia (Rickettsia like Bacteria - RLB) (Nguyễn Thị Thu Hà *et al.*, 2008; Đỗ Thị Hòa

et al., 2009). Ảnh kính hiển vi điện tử TEM mô tả tôm hùm

bị bệnh sữa cho thấy vi khuẩn có dạng hình cầu kích thước 0.6 μ m x 1.4 μ m đến 2.0 μ m (<http://www.oie.int>), không tiên mao, không có các lông trên bề mặt tế bào vi khuẩn và hầu như không thể nuôi cấy trên các môi trường dinh dưỡng nhân tạo. Một số nghiên cứu cho thấy, RLB cũng là tác nhân gây bệnh ở nhiều loài giáp xác khác nhau như gây bệnh hoại tử gan ở tôm he, cua Châu Âu *Carcinus maenas* (Eddy *et al.*, 2007), tôm sú (Nunan *et al.*, 2003). Tuy nhiên việc phát hiện RLB gặp nhiều khó khăn vì đó là loại vi khuẩn không nuôi cấy in vitro trên các môi trường nhân tạo mà thích hợp với vi khuẩn. Nghiên cứu môi trường tăng sinh, hình thái RLB và phát triển phương pháp sinh học phân tử nhằm phát hiện sự có mặt RLB ở tôm hùm bệnh sữa góp phần xác định tác nhân gây bệnh và đưa ra các biện pháp giúp ngăn chặn dịch bệnh trên tôm hùm nuôi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Mẫu tôm hùm bệnh sữa được thu tại Phú Yên và Nha Trang năm 2008 - 2009. Mẫu hemolymph tôm bệnh thu vào ống 1,5 ml chuyển về phòng thí nghiệm và bảo quản ở -20°C.

Phương pháp

Môi trường được sử dụng cho RLB sinh trưởng là Leibovitz L-15 có bổ sung muối NaCl với nồng độ 3%, 1% (Penicillin/streptomycin: 10000UI penicillin và 10mg/l streptomycin) và 10% FBS (Fetal Bovine Serum).

Môi trường kiểm tra vi khuẩn: marine agar-MA; TCBS; BHI, TSA.

Kính hiển vi điện tử truyền qua TEM và kính hiển vi điện tử quét SEM.

Tách DNA theo kit Genomic DNA Purification

Gen 16S rRNA



Hình 1. Sơ đồ vị trí 2 cặp mồi trên gen 16S rRNA

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nuôi RLB và hình thái vi khuẩn

Mẫu tôm hùm bệnh sữa điển hình với các dấu hiệu: bụng màu trắng đục; máu (hemolymph) có dạng trắng sữa, không đông; khi mở giáp đầu ngực thấy có nhiều dịch trắng đục như sữa lắng đọng.

Mẫu hemolymph được thu và bảo quản ở -20°C. Kiểm tra sự có mặt của RLB bằng phản ứng PCR khuếch đại đoạn gen 16S rRNA với cặp mồi đặc hiệu (<http://www.oie.int>).

Chuẩn bị mẫu để nuôi RLB: từ hemolymph tôm hùm bệnh sữa lấy 500 µl dịch sữa thêm 500 µl môi

Kit K0512 và khuếch đại đoạn gen 16S rRNA 254bp của RLB với cặp mồi đặc hiệu (MHD254f/MHD254r) có trình tự như sau:

MHD254f: 5'- CGA GGA CCA GAG ATG GAC CTT-3'.

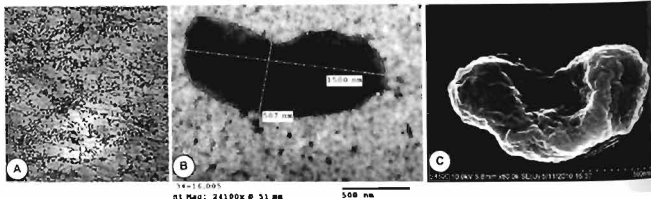
MHD254r: 5'- GCT CAT TGT CAC CGC CAT TC(T-3'.

Tách dòng và đọc trình tự gen 16S rRNA.

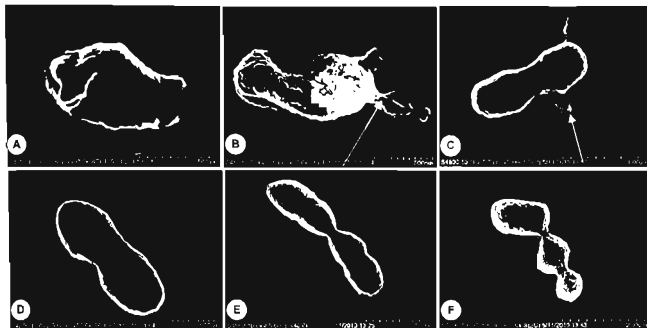
Sử dụng 2 cặp mồi (27f; 1525r) và (MHD254f/MHD254r) để xác định vi khuẩn và phát hiện RLB-MHD. Sơ đồ vị trí 2 cặp mồi như sau:

trường L-15; ly tâm 1000 v/ph trong 5 phút, thu dịch trên rồi chuyển vào bình nuôi tế bào 25 cm² chứa L-15 theo tỷ lệ 2%.

Quan sát mẫu dịch nuôi sau 7; 15; 21 ngày nhận thấy: môi trường có màu hồng nhạt (không thay đổi màu so với môi trường gốc), bọt đục và không lắng tủa với pH = 7.5. Như vậy có thể cho rằng RLB sinh trưởng được trong môi trường L-15 và những dịch nuôi RLB đó được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo. Một phần của dịch nuôi được cấy lên các môi trường thạch dinh dưỡng bao gồm: BHI; TSA; MA và môi trường TCBS để ở 28°C-30°C. Sau 48-96 giờ quan sát các đĩa thạch không thấy xuất hiện tế bào vi khuẩn trên tất cả các môi trường thạch. Như vậy bước đầu khẳng định RLB không phải là vi khuẩn.



Hình 2. Ảnh chụp KHV hình thái RLB. A. Ảnh nhuộm Gram; B. Ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua-TEM; C. Ảnh kính hiển vi điện tử quét - SEM.



Hình 3. Hình ảnh phân chia TB của RLB. A: RLB tương tự trực khuẩn; B: Tạo chồi; C: Phân chia và tạo chồi; D: Phân chia đôi đều 2 cực; E: Phân chia 4 tế bào 2 cực; F: Phân chia đôi lệch cực.

Hình thái RLB

Sinh khối tế bào thu được sau khi nuôi trong L-15 đem nhuộm Gram âm theo Hucker cải tiến và chụp kính hiển vi điện tử. Kết quả được chỉ ra như sau:

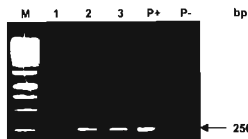
Trên hình 2a ảnh tiêu bản cho thấy tế bào giống với vi khuẩn gram âm; có hình hạt đậu. Trên ảnh chụp kính hiển vi (KHV) điện tử truyền qua TEM (hình 2b) và ảnh chụp KHV điện tử quét SEM (hình 2c) nhận thấy tế bào có hình dạng hơi cong kích thước 500 x 1500nm, không có tiêm mao, không có lông (thể pili). Do không có tiêm mao hoặc thể pili cho nên tế bào vi khuẩn không bám vào bề mặt thạch để sinh trưởng.

Các ảnh kính hiển vi điện tử quét thể hiện rằng quá trình sinh sản phân chia của RLB theo nhiều dạng: phân đôi, phân 4 đồng tâm hoặc lệch cực; một số tế bào có chồi và bám vào nhau (hình 3a, 3b, 3c, 3d, 3e, 3f). Sự sinh sản theo cách phân đôi tế bào ở RLB cũng tương tự như ở vi khuẩn.

Kết quả PCR kiểm tra RLB

Sinh khối thu được sau khi nuôi, được đem tách DNA và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR khuếch đại đoạn DNA đặc trưng của RLB bằng cặp mồi (MHD254f; MHD254r) (<http://www.oie.int> 2008).

Trên hình 4 trình bày kết quả PCR kiểm tra RLB trong các mẫu nuôi. Các đường chạy 1, 2, 3 trên điện di đồ tương ứng với mẫu nuôi RLB sau thời gian 7; 15; 21 ngày và đều cho kết quả dương tính. Như vậy sử dụng môi trường L-15 bổ sung 3% NaCl và 10% FBS đã nuôi RLB được 21 ngày.



Hình 4. Sản phẩm PCR đoạn gen 254 bp 16S rRNA của RLB. M: thang chuẩn 1 kb; P+ chứng dương; P- chứng âm; 1- RLB nuôi sau 7 ngày, 2: 15 ngày, 3: 21 ngày.

Kết quả tách dòng và đọc trình tự gen 16S rRNA của RLB

Trong số các mẫu DNA từ mẫu tôm bệnh sửa đã phát hiện RLB bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu RLB (MHD254f; MHD254r) chọn 1 mẫu từ Nha Trang (RLB1) và 1 mẫu từ Phú Yên (RLB2) cho các nghiên cứu tiếp theo. Để tìm hiểu trình tự đoạn gen

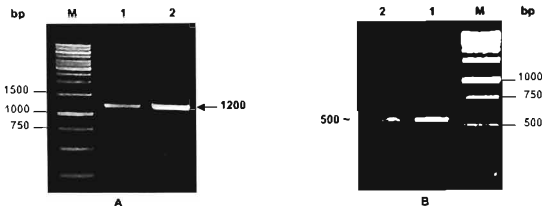
16S rRNA của 2 mẫu RLB1 và RLB2, các cặp mỗi (27f; MHD254r) và (MHD254f; 1525r) được sử dụng để khuếch đại 2 đoạn gen lần lượt là 1200 bp và 500 bp trên gen 16S rRNA bằng phương pháp PCR từ 2 mẫu RLB1 và RLB2. Kết quả được trình bày trên hình 5.

Sản phẩm PCR của đoạn DNA có kích thước 1200 bp và 500 bp (Hình 5 A, B) được làm sạch, tạo dòng bằng vector pCR 2.1-TOPO và đọc trình tự. Sau khi giải trình tự và hai đoạn gen này được ghép nối và nhận được trình tự 16S rRNA của RLB1 và RLB2 khoảng 1500 bp (trừ đi đoạn gen 245 bp ở phần cuối và đầu của đoạn 1200 bp và 500 bp) từ 2 mẫu nghiên cứu trên. Sau đó 2 trình tự này được đăng kí trên Ngân hàng gen Quốc tế với mã số HQ130336; HQ130337.

So sánh trình tự của RLB1; RLB2 với trình tự với gen 16S rRNA khuếch đại từ RLB nhiễm trên

tôm hùm, tôm sú có sự tương đồng cao 99% với trình tự GU947658 (vi khuẩn không nuôi cấy từ tôm hùm bệnh sứa Việt Nam); 96% với trình tự GU947655 (tôm sú *Penaeus monodon* MozzanBic); GU947657 (*Penaeus monodon* Tanzannia) và chỉ giống 85% với trình tự GU947656 (*Penaeus monodon* Madagascar). Và các vị trí khác nhau nhiều ở vùng từ 800 bp đến 1100 bp. Kết quả so sánh trình tự 16S rRNA của RLB với một số trình tự trên GenBank được trình bày ở (Hình 6).

So sánh trình tự gen 16S rRNA của RLB với các trình tự trên Ngân hàng gen Quốc tế và phân tích mối quan hệ phát sinh loài (Hình 7) có thể kết luận: RLB thuộc α -proteobacteria; bộ rickettsia và cũng là loại vi khuẩn không nuôi cấy được mà phòng thí nghiệm của Mỹ nghiên cứu và công bố trình tự GU947658.



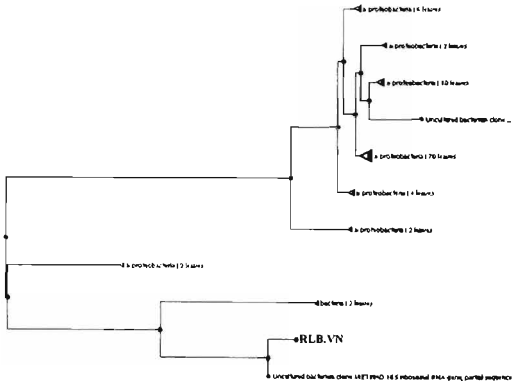
Hình 5. A. Sản phẩm PCR đoạn 1200 bp. M. thang chuẩn 1 kb; 1, 2: đoạn gen 1200 bp 16S rRNA của RLB1; RLB2. B. Sản phẩm PCR đoạn 500 bp. M. thang chuẩn 1 kb; 1, 2: đoạn gen 500 bp 16S rRNA của RLB1; RLB

RLB	1	GAGTAACGCGTGGGAACCTACCT-GGTGGTACGGAAATAACGCAGGGAAACTTGTGCTAAT	59
GU947658	1T.....	59
GU947657	1A.N.....T.....	60
GU947655	1-A.....T.....	59
RLB	60	ACCSTATAAGCCCTTAGGGGAAAGATTTATCGCCATTGAATGGGCCCGCTTGGATTAG	119
GU947658	60	119
GU947657	61C.....T.....AG.....	120
GU947655	60C.....T.....AG.....	119
RLB	120	CTTGTGTGGTGGGTAATGGCCATACCAAGCGCAGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATGAT	179
GU947658	120	179
GU947657	121	..A.....G.....N.....	180
GU947655	120	..A.....G.....	179
RLB	180	CAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGAGGCAGCAGTGAGGAATAT	239
GU947658	180	239
GU947657	181N.....G.....	240
GU947655	180G.....	239

RLB	240	TGGCAATGGGGAAACCCCTGATCCAGCCATGCCCGGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGGTT	299
<u>GU947658</u>	240	299
<u>GU947657</u>	241	300
<u>GU947655</u>	240	299
RLB	300	GTAAGCTCTTTCACCGCGGAAGATAATGACGGTAGCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACT	359
<u>GU947658</u>	300T.....	359
<u>GU947657</u>	301T.....A.....	360
<u>GU947655</u>	300T.....A.....	359
RLB	360	TCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTGGAATCACTGGGCGTA	419
<u>GU947658</u>	360	419
<u>GU947657</u>	361	420
<u>GU947655</u>	360	419
RLB	420	AAGCACACGTAGGGCGACTGTTTAGTCGGGGGTGAAATCCTGAGGCTCAACCTCAGAACT	479
<u>GU947658</u>	420	...G.....	479
<u>GU947657</u>	421	...G.G.....T.A.....	480
<u>GU947655</u>	420	...G.G.....T.A.....	479
RLB	480	GCCTCCGATACTGACAGTCTAGAGTCCGGGAAGAGGTGAGTGGAAATCCGAGTGGAGAGGT	539
<u>GU947658</u>	480	539
<u>GU947657</u>	481GT.A.....	540
<u>GU947655</u>	480GT.A.....	539
RLB	540	GAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAGTGGCGAAGCGGCTCACTGGTCCGGTACTG	599
<u>GU947658</u>	540	599
<u>GU947657</u>	541	600
<u>GU947655</u>	540	599
RLB	600	ACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCG	659
<u>GU947658</u>	600	659
<u>GU947657</u>	601T.....	660
<u>GU947655</u>	600T.....	659
RLB	660	TAAACGATGAATGCCAGCCGTCGGGGGCGATGCCCTTCGGTGGCGCAGTTAACGCATTA	719
<u>GU947658</u>	660	719
<u>GU947657</u>	661T...T...T.....	720
<u>GU947655</u>	660T...T...T.....	719
RLB	720	GCATTCGCCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCCG	779
<u>GU947658</u>	720	779
<u>GU947657</u>	721	780
<u>GU947655</u>	720	779
RLB	780	CACAAGCGGT-GGAGCATGTGGTTTAATTGAAAGCAACGCCAGAACCTTACCAGCC-CT	837
<u>GU947658</u>	780-.....-.....	837
<u>GU947657</u>	781-.....T.....	838
<u>GU947655</u>	780G.....T.....	839
RLB	838	TGACATCCCGATCGCGAGGACCAGAGATGGACCTTTTCAGTTCGGCT-GGATCGGAGACA	896
<u>GU947658</u>	838-.....	896
<u>GU947657</u>	839A.....T.C.....T.....	897
<u>GU947655</u>	840A.....T.C.....G.....T.....	899
RLB	897	GGTGTGC-ATGGCTGTCTGTCAGCTCGTG-TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACG	954
<u>GU947658</u>	897-.....-.....	954
<u>GU947657</u>	898-.....	955
<u>GU947655</u>	900A.....T.....	959
RLB	955	AGCGCAACCC-TCGCCCTTAGTTGCCAGCATTGAGTGGGCAC-TCTAAGGGGACTGCCG	1012
<u>GU947658</u>	955-.....-.....	1012
<u>GU947657</u>	956-.....T.....TG.....GA.....	1013
<u>GU947655</u>	960T.....T.....TG.....T.....GA.....	1019

RLB	1013	GTGATAAGCCGGAGGAAGGTGGGATGACGT-CAAGTCTCATGCCCTTACGGGCTGGG	1071
<u>GU947658</u>	1013	1071
<u>GU947657</u>	1014T.....	1072
<u>GU947655</u>	1020C..G.....T.....	1079
RLB	1072	CTACACACGTGCTACAATGGCGGTGACAATGAGCAGCGATCCCGAAGGGTTAGCTAATC	1131
<u>GU947658</u>	1072	1131
<u>GU947657</u>	1073TG.....	1132
<u>GU947655</u>	1080TG.....	1137
RLB	1132	TCCAAAAACCGTCTCAGTTCGGATTGTACTCTGCAACTCGAGTGCAAGTTGGAATCG	1191
<u>GU947658</u>	1132	1191
<u>GU947657</u>	1133	1192
<u>GU947655</u>	1138	1197
RLB	1192	CTAGTAAATCGTAAATCAGCATGCTA-CGGTGAATACTTCCCGGCCCTTGACACACC	1248
<u>GU947658</u>	1192G.....	1248
<u>GU947657</u>	1193G.....	1249
<u>GU947655</u>	1198G.....C.....	1255

Hình 6. So sánh trình tự 16S rRNA của RLB với một số trình tự trên GenBank.



Hình 7. Mối quan hệ phát sinh loài của RLB

KẾT LUẬN

Vi khuẩn sinh trưởng trong môi trường L-15 nhưng không sinh trưởng ở môi trường thạch nhân tạo. Đặc điểm hình thái vi khuẩn: gram âm; hình que; không tiên mao, kích thước 0,5 x 1,500 μm . Sinh sản phân chia tương tự vi khuẩn: phân đôi, phân

4 dòng tâm hoặc lệch cực; một số có chồi và bám vào nhau.

Trình tự gen 16S rRNA của RLB tương đồng 97 - 99% với nhiều trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn không nuôi cấy được tìm thấy ở tôm hùm và tôm sú bị bệnh sù.

Cần cứ đặc điểm hình thái và trình tự gen 16S rRNA của vi khuẩn tìm thấy ở tôm hùm bị bệnh sữa có thể kết luận vi khuẩn là RLB thuộc α -proteobacteria.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện bởi kinh phí của đề tài nghiên cứu KHCN cấp Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Nguyễn Thị Thu Hà, Đỗ Thị Hòa, Đồng Thanh Hà (2008) Nghiên cứu biến đổi trong các tổ chức của tôm hùm bông *Panulirus ornatus* bị bệnh sữa bằng phương pháp mô hình học www.nnu.edu.vn/2008

Đỗ Thị Hòa, Nguyễn Từ Cương, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Thủy Giang, Phan Văn Út, Nguyễn Thị Huệ, Đồng Thanh Hà (2009) Tác nhân gây bệnh sữa ở tôm hùm nuôi ở miền trung Việt nam. *Tap chi Khoa học công nghệ thủy sản số 02-03/2009*.

Eddy F, Powell A, Gregory S, Nunan LM, Lightner DV, Dyson PJ, Rowley AF, Shields RJ (2007) A novel bacterial disease of the European shore crab, *Carcinus maenas*

molecular pathology and epidemiology. *Microbiology* 152: 2839-2849.

Kasetsart J (2009) The Effects of Microsporidian (Thelohanria) Infection on the Growth and histopathological Changes in Pond-reared Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Nat Sci* 43: 680-688.

Nunan LM, Poulos HT, Redman R, Le Groumellec M, Lightner DV (2003) Molecular detection methods developed for a systemic rickettsia-like bacterium (RLB) in *Penaeus monodon* (Decapoda: Crustacea) *Dis Aquat Org* 53: 15-23.

Megan M Montgomery-Fullerton, Roland A Cooper, Kathryn M Kauffman, Jeffrey D Shields, Robert E Ratzlaff (2007) Detection of *Panulirus argus* Virus 1 in Caribbean spiny lobsters *Dis Aquat Org* 76: 1-6.

<http://www.ojg.in> 2008

Shields JD, Behringer DC Jr (2004) A new pathogenic virus in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from the Florida Keys. *Dis Aquat Org* 59: 109-118

Yasinari Kiryu, Donald C. Behringer, Jan H. Landsberg, Barbara D. Petty (2009) Microsporidiosis in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* from southeast Florida, USA *Dis Aquat Org* 84: 237-242.

THE MORPHOLOGIC CHARACTERISTICS AND 16S rRNA GENE SEQUENCE OF RICKETTSIA LIKE BACTERIA IN SPINY LOBSTER (*PANULIRUS ORNATUS*) WITH MILKY HAEMOLYMPH DISEASE

Nguyen Chi Thuan, Pham Ngoc Long, Nguyen Quang Vinh, Nguyen Thi Thanh Loi*

Institute of Biotechnology

SUMMARY

A variety of diseases caused by Rickettsia bacteria like - RLB has occurred in crustaceans such as crabs, prawns and made significant economy lose. Particularly RLB-caused disease seriously occurred in spiny lobster farms in 2007 in Vietnam and continuous every year. This study presents the results of morphologic characteristics and 16S rRNA gene sequence of RLB infected spiny lobster (*Panulirus ornatus*) with milky disease in Vietnam. The causative agent of the disease was believed to be a gram-negative bacterium including RLB that could not be cultured on a range of agar-based media. Morphologic studies by TEM, SEM and the sequence analysis of 16S rRNA gene from RLB have indicated that they are a previously undescribed species of α -proteobacteria and belong to Rickettsia. The 16S rRNA gene sequences have been registered on Genbank database with the accession number HQ130336 and HQ130337. The results of the comparison between the above two sequences and some other sequences of *C. maenas*, *P. monodon* and *Panulirus* spp on GenBank database showed the highly similar sequence

Keywords: *Electronic microscopy, Milky haemolymph disease, 16S rRNA gene, Rickettsia, Spiny lobster*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37913692; E-mail: nthanhloi@yahoo.com