

# KẾT QUẢ XÁC ĐỊNH LOÀI *V. HARVEYI*, *V. VULNIFICUS*, *V. PARAHAEMOLYTICUS*, *V. ALGINOLYTICUS* TRÊN CÁ CHỀM NUÔI TẠI KHÁNH HÒA

Vũ Khắc Hùng

Phân viện Thú y miền Trung

## TÓM TẮT

Từ 191 mẫu cá chẽm nghi mắc bệnh do vi khuẩn *Vibrio*, đã phân lập được vi khuẩn *Vibrio* spp. trong 149 mẫu (78,01%). Trong 149 mẫu trên, phân lập được 175 chủng vi khuẩn *Vibrio*. Khi xác định loài trong tổng số 175 chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. cho thấy loài *V. harveyi* chiếm tỷ lệ cao nhất (45,71% - 80/175), tiếp theo là *V. vulnificus* (29,71% - 52/175), *V. parahaemolyticus* (12,57% - 22/175), *V. alginolyticus* (4,57% - 8/175) và có 13/175 chủng (7,43%) chưa xác định được loài. Kết quả so sánh trình tự gen *16S rRNA* của 2 chủng *V. harveyi* phân lập tại Khánh Hòa cho thấy hai chủng này tương đồng 99,2% - 99,93% với các chủng *V. harveyi* trên Ngân hàng Gen và chủng tham chiếu ATCC 33843. Kết quả xác định tỷ lệ nhiễm các chủng *Vibrio* trên cá chẽm nuôi tại Khánh Hòa là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về lựa chọn các chủng điển hình để phát triển vaccin phòng bệnh do *Vibrio* trên cá chẽm.

Từ khóa: *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, cá chẽm.

## Result of identifying *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* species in barramundi raising in Khanh Hoa province

Vu Khắc Hùng

## SUMMARY

From 191 barramundi (*Lates calcarifer*) suspected with Vibriosis, we identified *Vibrio* spp. in 149 samples. The results of species determination showed that among 175 isolates, the *Vibrio harveyi* accounted for the highest prevalence (45.71% - 80/175), followed by *V. vulnificus* (29.71% - 52/175), *V. parahaemolyticus* (12.57% - 22/175), *V. alginolyticus* (4.57% - 8/175), and 13/175 (7.43%) was not specified. The similarity level of *16S rRNA* gene sequences of two *V. harveyi* strains isolated in Khanh Hoa were 99.2% - 99.93% in comparison with those of *V. harveyi* strain on GenBank and the reference strain ATCC 33843. The results of identifying *Vibrio* species on barramundi raising in Khanh Hoa province are premise for further studies on selecting representative strains to develop vaccines against Vibriosis on barramundi.

Keywords: *Vibrio harveyi*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, barramundi.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngành nuôi trồng thủy sản ở nước ta ngày càng phát triển, trong đó nghề nuôi cá biển giai đoạn 2010-2019 đã có những bước phát triển đáng kể, diện tích và sản lượng không ngừng tăng. Tổng diện tích nuôi biển năm 2010 đạt 38.800 ha, đến năm 2019 đạt 256.479 ha với tốc độ tăng trưởng bình quân đạt 23,3%/năm. Trong đó, cá chẽm nhờ những đặc tính tốt như dễ thích nghi môi trường, tăng trọng nhanh và giá trị kinh tế cao, thị trường xuất khẩu ổn định nên cá chẽm được xem là mũi nhọn trong thị trường nuôi trồng thủy sản. Tuy nhiên, nghề nuôi cá chẽm ở nhiều nước trên thế giới cũng như Việt Nam đang phải đối mặt với những

thách thức không nhỏ từ vấn đề dịch bệnh; trong số đó có nhiễm khuẩn do *Vibrio* spp. gây ra (FAO, 2017). Bệnh Vibriosis thường xảy ra tại các trang trại nuôi cá biển ở 1 số nước châu Á với điều kiện khí hậu nhiệt đới (Albert và Ransangan, 2013). Trong nhiều ổ dịch trên cá chẽm, cá mú; vi khuẩn *V. harveyi* thường chiếm tỷ lệ cao nhất, tiếp đến là *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và *V. anguillarum*. Tại Trung Quốc, cá đồ dạ (large yellow croaker) nuôi tại vịnh Tượng Sơn (Xiangshan Bay) cũng bị nhiễm nặng với các loài *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* và *V. alginolyticus* (Liu và cs., 2016). Tại Việt Nam, theo nghiên cứu của Bùi Quang Mạnh (2012) khi phân tích 270 mẫu bệnh phẩm cá có dấu hiệu nhiễm khuẩn (lở loét, xuất huyết)

cho thấy có 48,4% mẫu bị nhiễm vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn trên các mẫu cá bệnh cho thấy tỷ lệ nhiễm bệnh vi khuẩn của cá chêm là cao nhất với 66,7%; tiếp đến là cá hồng (44,2%). Cá bớp và cá mú có tỷ lệ nhiễm lần lượt là 42,6% và 40,0%. Thành phần loài vi khuẩn gây bệnh được định danh gồm *V. harveyi*, *V. vulnificus*.

Để có cơ sở cho việc lựa chọn các chủng vi khuẩn trong công tác nghiên cứu và phát triển vaccin phòng bệnh Vibriosis, chúng tôi thực hiện đề tài “Xác định tỷ lệ nhiễm *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* trên cá chêm nuôi tại Khánh Hòa”.

## II. NỘI DUNG, NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nội dung nghiên cứu

- Phân lập vi khuẩn từ cá chêm nghi nhiễm *Vibrio* spp. tại Cam Ranh, Nha Trang và Ninh Hòa (tỉnh Khánh Hòa).

- Xác định tỷ lệ nhiễm *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus*

- Phân tích phả hệ *V. harveyi* phân lập.

### 2.2. Nguyên liệu

- Cá chêm nghi mắc bệnh do *Vibrio* từ các trại nuôi tại huyện Cam Ranh, Nha Trang và Ninh Hòa.

- Các loại môi trường nuôi cấy phân lập vi khuẩn *Vibrio*: TCBS, TSB, thạch máu,....

- Môi và các sinh phẩm sử dụng trong phản ứng PCR.

### 2.3. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.3.1. Phân lập vi khuẩn

Phương pháp lấy mẫu: Mẫu cá nghi nhiễm *Vibrio* được thu thập, bảo quản trong thùng lạnh 2-8°C và chuyển về phòng thí nghiệm thuộc Bộ môn Công nghệ Sinh học, Phân viện Thú y miền Trung trong ngày để phân tích.

Phương pháp phân lập vi khuẩn: Mẫu bệnh phẩm gan và thận được ria cấy lên môi trường thạch TCBS, nuôi cấy ở 28°C trong vòng 24h. Chọn các khuẩn lạc màu xanh, vàng trên môi trường TCBS, nhuộm gram để quan sát hình thái.

#### 2.3.2. Phương pháp định danh vi khuẩn

Vi khuẩn *Vibrio* chọn lọc được định danh bằng phản ứng PCR đơn môi sử dụng cặp môi đặc hiệu, trình tự cặp môi được trình bày bảng 1 và thành phần phản ứng được thể hiện ở bảng 2. Chu trình nhiệt cho phản ứng gồm giai đoạn biến tính ban đầu ở 94°C trong 2 phút, sau đó là 30 chu kỳ gồm biến tính ở 94°C trong 30 giây, bắt cặp môi ở 55°C trong 30 giây và tổng hợp ở 72°C trong 1 phút. Giai đoạn kéo dài ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm của phản ứng PCR được điện di trên gel agarose 1,2% trong dung dịch TBE (Tris-base, EDTA, acid boric), nhuộm bằng ethidium bromide, kết quả được đọc bằng hệ thống máy đọc Gel.

**Bảng 1. Cặp môi sử dụng trong phản ứng PCR**

Tên cặp môi	Trình tự môi (5'-3')	Gen đích/vi khuẩn phát hiện	Kích cỡ (bp)	Tài liệu tham khảo
16F27	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	16S rRNA	1500	Bayane và cs. (2006)
16R1522	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA			
Vh-hly1F	GAGTTCGGTTTCTTTCAAG	hly genes/ <i>V. harveyi</i>	454	S. Haldar và cs. (2010)
Vh-hly1R	TGTAGTTTTTCGCTAATTC			
Vv F	CAGCC GGACG TCGTCCATTT TG	hypothetical protein VV2055/ <i>V. vulnificus</i>	484	
Vv R	ATGAG TAAGC GTCCGACGCG T			
Vp F	AGCTT ATTGG CGGTTTCTGT CGG	hypothetical protein VPA1095/ <i>V. parahaemolyticus</i>	297	Kim và cs. (2015)
Vp R	CKCAA GACCAAGAAAAGCCG TC			
Va F	ACGGC ATTGG AAATTGCGAC TG	whole genome shotgun sequence/ <i>V. alginolyticus</i>	199	
Va R	TACCC GTCTC ACGAGCCCAA G			

**Bảng 2. Thành phần của phản ứng PCR**

Thành phần phản ứng	Thể tích (μl)
Nước (free RNA)	9,5
2X Reaction (2x My Taq Mix, Bioline)	12,5
Mồi xuôi	0,5
Mồi ngược	0,5
DNA	2,0
<b>Tổng</b>	<b>25,0</b>

### 2.3.3. Giải trình tự và phân tích đặc điểm di truyền vi khuẩn *V. haveyi*

Vi khuẩn *V. haveyi* được khuếch đại và giải trình tự gen *16S rRNA* sử dụng cặp mồi 16F27 và 16R1522 (Bayane và cs., 2006), chiều dài đoạn gen khuếch đại là 1500bp. Trình tự nucleotide trên gen *16S rRNA* được giải mã và xử lý bằng phần mềm BioEdit (phiên bản 7.2.5). Trình tự gen *16S rRNA* được so sánh với trình tự nucleotide gen *16S rRNA* của các chủng *V. haveyi* tham chiếu trên GenBank bằng phần mềm Blast. Phân tích phá hệ bằng phần mềm Mega (phiên bản 10.1.8) dựa trên phương pháp Maximum likelihood. Độ tin cậy được kiểm tra bằng bootstrap với 1000 lần lặp lại.

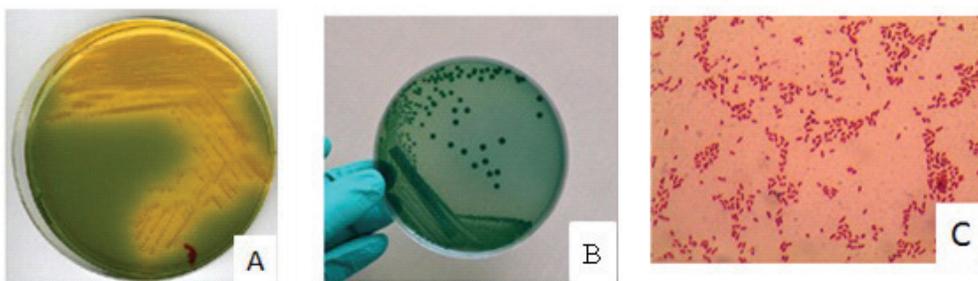
## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn *Vibrio* từ cá nghi mắc bệnh

Các mẫu cá khi chuyển về phòng thí nghiệm được kiểm tra hình thái bên ngoài thấy có các dấu hiệu bệnh lý như: màu cơ thể cá trở nên tối, có các vết loét đỏ trên cơ thể, tích dịch ở bụng, mắt đục, bụng có màu đỏ, xuất hiện vùng hoại tử trên thân (hình 1). Khi mổ khám quan sát thấy có các vùng hoại tử và xuất huyết ở thận, gan và lách.



**Hình 1. Cá nghi mắc bệnh do *Vibrio* thu được**



**Hình 2. Vi khuẩn *Vibrio* trên môi trường TCBS (A, B) và hình thái khi nhuộm gram (C)**

Để phân lập vi khuẩn *Vibrio*, chúng tôi đã tiến hành ria cấy mẫu bệnh phẩm gan và thận từ cá nghi mắc bệnh trên các loại môi trường TCBS và thạch máu, ủ ở 28°C trong 24h. Trên môi trường TCBS, chọn tất cả khuẩn lạc bằng phẳng màu vàng, màu xanh lá, đường kính 2-3mm (hình 2) để kiểm tra hình thái. Vi khuẩn *Vibrio* bắt màu gram âm, hình que thẳng hoặc hơi

cong, có thể dạng trực khuẩn ngắn, kích thước 0,3-0,5 x 1,4-2,6 μm (hình 2). Chúng không hình thành bào tử và chuyển động nhờ một tiên mao hoặc nhiều tiên mao mảnh. Sau đó, chúng tôi tiến hành định danh vi khuẩn phân lập được bằng phương pháp PCR để xác định các chủng vi khuẩn gây bệnh là *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. haveyi* hay *V. alginolyticus*,...

**Bảng 3. Kết quả phân lập vi khuẩn *Vibrio* từ cá chẻm có triệu chứng nghi mắc bệnh**

Năm lấy mẫu	Số mẫu thu thập	Số mẫu nhiễm	Tỷ lệ (%)
2019	99	66	66,67
2020	92	83	90,22
<b>Tổng</b>	<b>191</b>	<b>149</b>	<b>78,01</b>

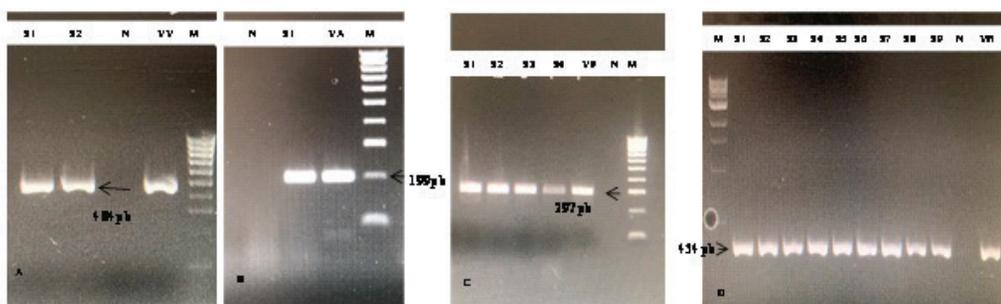
Kết quả ở bảng 3 cho thấy, từ 191 mẫu cá có triệu chứng nghi mắc bệnh đã phân lập được vi khuẩn *Vibrio* từ 149 cá; chiếm tỷ lệ 78,01%. Trong đó tỷ lệ cá dương tính với vi khuẩn *Vibrio* năm 2020 cao hơn hẳn năm 2019 với tỷ lệ nhiễm lần lượt là 90,22% và 66,67% .

Bùi Quang Mạnh (2012) phân tích 270 mẫu bệnh phẩm cá có dấu hiệu nhiễm khuẩn (lở loét, xuất huyết) cho biết có 48,4% mẫu bị nhiễm vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh. Kết quả phân lập và định danh vi khuẩn trên các mẫu cá bệnh cho thấy tỷ lệ nhiễm của cá chẻm là cao nhất với 66,7%; tiếp đến là cá hồng (44,2%). Cá bớp và cá mú có tỷ lệ nhiễm lần lượt là 42,6 và 40,0%. Thành phần loài vi khuẩn gây bệnh được định danh

gồm *V. harveyi* và *V. vulnificus*.

**3.2. Kết quả định danh vi khuẩn**

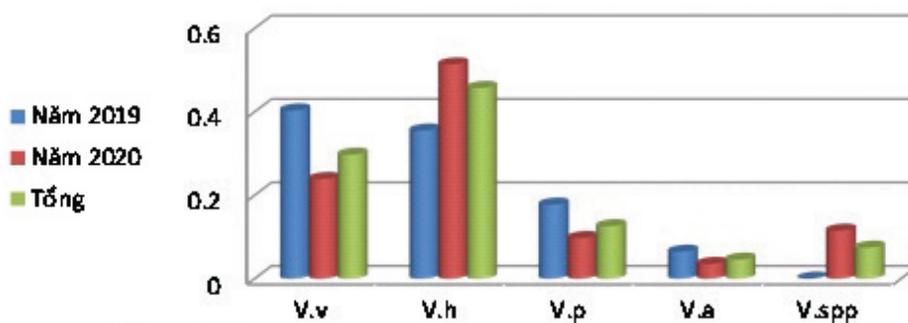
Tất cả 175 chủng vi khuẩn *Vibrio* sau khi phân lập từ 149 mẫu cá nhiễm đều được giám định bằng phản ứng PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu. Kết quả giám định PCR cho thấy hơn 92% các chủng phân lập đều được xác định là 1 trong 4 chủng *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*. Các chủng dương tính có chiều dài đoạn gen khuếch đại tương đương với chiều dài đoạn gen đích của cặp mồi đặc hiệu được sử dụng, các băng vạch đều đặc hiệu (hình 3). Kết quả định danh được trình bày ở bảng 4.



**Hình 3. Sản phẩm PCR khuếch đại gen đặc hiệu *V. vulnificus* (A), *V. alginolyticus* (B), *V. parahaemolyticus* (C) và *V. harveyi* (D)**

**Bảng 4. Kết quả xác định loài vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ cá chẻm có triệu chứng nghi mắc bệnh**

Phân loại <i>Vibrio</i>	Tổng		Năm 2019		Năm 2020	
	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)	n	Tỷ lệ (%)
<i>V. vulnificus</i>	52	29,71	25	40,32	27	23,89
<i>V. harveyi</i>	80	45,71	22	35,48	58	51,33
<i>V. parahaemolyticus</i>	22	12,57	11	17,74	11	9,73
<i>V. alginolyticus</i>	8	4,57	4	6,45	4	3,54
<i>Vibrio</i> spp.	13	7,43	0	0,00	13	11,50
<b>Tổng</b>	<b>175</b>	<b>100,00</b>	<b>62</b>	<b>100,00</b>	<b>113</b>	<b>100,00</b>



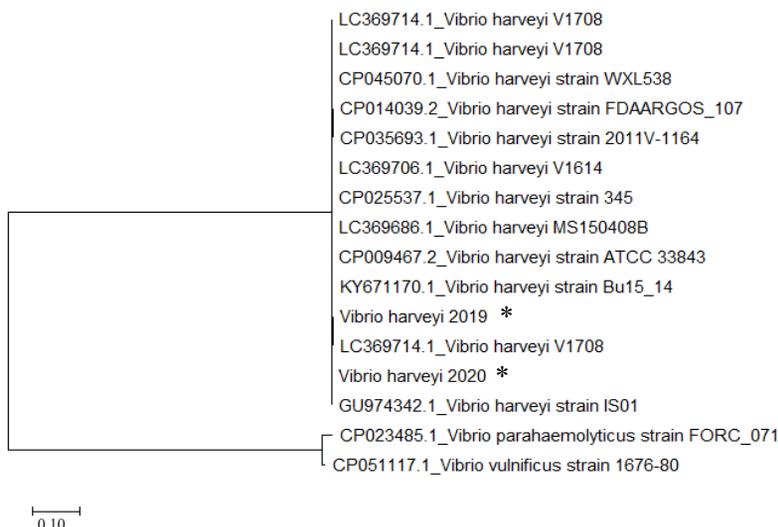
Hình 4. Tỷ lệ loài vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ cá chêm có triệu chứng nghi mắc bệnh

Bảng 4 cho thấy tỷ lệ của các loài *V. harveyi*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* trong tổng số 175 chủng vi khuẩn *Vibrio* thu thập được trong thời gian 2 năm 2019-2020. Bằng phản ứng PCR, chúng tôi xác định được 4 loài *Vibrio* là nguyên nhân gây bệnh cho cá chêm, trong đó loài *V. harveyi* chiếm tỷ lệ cao nhất (45,71%); đặc biệt trong năm 2019 tỷ lệ nhiễm này lên đến 51,33%. Bên cạnh *V. harveyi*, *V. vulnificus* cũng là tác nhân gây bệnh chủ yếu; năm 2020, tỷ lệ nhiễm bệnh do vi khuẩn này còn nhiều hơn do *V. harveyi* gây ra. Còn lại là do *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* và các loài *Vibrio* khác (hình 4).

Tương tự như kết quả của chúng tôi, Ransangan (2009) khi phân tích 21 chủng vi khuẩn *Vibrio* phân

lập từ gan, thận, lách của cá chêm đã định danh được 4 chủng *V. harveyi*, 16 chủng *V. parahaemolyticus* và 1 chủng *V. alginolyticus*. Trong một nghiên cứu khác của Đồng Thanh Hà và cs. (2017), 7/15 chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập (46,67%) là *V. harveyi*. Theo tác giả Ajdari (2018), trong 110 mẫu cá chêm (80 mẫu cá nghi nhiễm *Vibrio*, 30 mẫu cá khỏe) ở các thành phố phía nam Iran, 46 chủng (70,76%) vi khuẩn phân lập được là *V. harveyi*. Trong nghiên cứu của Tendencia (2002), có 44 chủng *Vibrio* phân lập từ cá chêm theo đặc tính hình thái và sinh hóa, trong đó 41 chủng *V. harveyi* (93%), 1 chủng *V. logei* và 2 chủng *V. campbellii*.

### 3.3. Phân tích phổ hệ *V. harveyi*



Hình 5. Cây phả hệ gen 16S rRNA của 2 chủng vi khuẩn *V. harveyi* phân lập (\*)

Kết quả định danh cho thấy *V. harveyi* là vi khuẩn được phân lập nhiều nhất ở cá chêm nghi mắc bệnh. Phân tích cây phả hệ 2 chủng *V. harveyi* phân lập được trên cá chêm cho thấy cả 2 chủng đều cùng nhóm với

chủng vi khuẩn *V. harveyi* tham chiếu (ATCC 33843). Trong khi đó, chủng có nguồn gốc di truyền gần gũi với *V. harveyi* như *V. vulnificus* và *V. parahaemolyticus* thuộc nhóm hoàn toàn khác (hình 5). Kết quả này

khẳng định rằng, 2 chủng *V. harveyi* phân lập năm 2019 và 2020 trên cá chêm nghi mắc bệnh do *Vibrio* gây ra đều thuộc loài *V. harveyi*.

Kết quả so sánh sự tương đồng gen *16S rRNA* cho thấy chủng *V. harveyi* phân lập năm 2019 tương đồng 99,73% nucleotide với chủng phân lập năm 2020. Cả 2 chủng *V. harveyi* phân lập trên cá chêm tại Khánh Hòa tương đồng 99,2%-99,93% với các chủng vi khuẩn *V. harveyi* trên Ngân hàng Gen (mã số CP009467) và chủng tham chiếu ATCC 33843.

#### IV. KẾT LUẬN

- Tỷ lệ phân lập *Vibrio* trên môi trường đặc hiệu từ cá chêm nghi mắc bệnh là 78,01%.

- Kết quả định danh vi khuẩn *Vibrio* bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu cho thấy: các chủng vi khuẩn phân lập được gồm *V. harveyi* (45,71%), *V. vulnificus* (29,71%), *V. parahaemolyticus* (12,57%), *V. alginolyticus* (4,57%) và *Vibrio* spp. (7,43%).

- Kết quả so sánh trình tự gen *16S rRNA* của 2 chủng *V. harveyi* phân lập tại Khánh Hòa năm 2019 và 2020 tương đồng 99,73% và chủng phân lập tương đồng 99,2% - 99,93% với các chủng vi khuẩn *V. harveyi* trên Ngân hàng Gen và chủng tham chiếu ATCC 33843.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bùi Quang Mạnh, 2012. Nghiên cứu một số bệnh thường gặp trên một số loài cá biển nuôi tại tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu đề xuất giải pháp phòng trị. Báo cáo kết quả đề tài nghiên cứu tỉnh Bà Rịa - Vũng Tàu.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2017. *Fishery and Aquaculture Statistics - Global production by production source 1950-2015*.
- Abert, V., and Ransangan, J., 2013. Original article effect of water temperature on susceptibility of culture marine fish species to Vibriosis. *International Journal of Research in Pure and Applied Microbiology* 3:48-52.
- Lui, L., Ge, M., Zheng, X., Tao, Z., Zhou, S., and Wang, G., 2016. Investigation of *Vibrio alginolyticus*, *V. harveyi*, and *V. parahaemolyticus* in large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* (Richardson) reared in Xiangshan Bay, China. *Aquaculture Reports* 3:220-224. doi:10.1016/j.aqrep.2016.04.004.
- Bayane A, Dominique R, Robin DD, Jacqueline D, Brehima D, Philippe T, 2006. Assessment of the physiological and biochemical characterization of a *Lactic acid bacterium* isolated from chicken faeces in Sahelian region. *Afr. J. Biotechnol.* 5(8):629-634.
- Haldar S, Neogi SB, Kogure K, Chatterjee S, Chowdhury N, Hinenoya A, et al., 2010. Development of a haemolysin gene-based multiplex PCR for simultaneous detection of *Vibrio campbellii*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Lett Appl Microbiol* 2010; 50:146-52.
- Kim H.J., Ryu J.O., Lee S.Y., Kim E.S. và Kim H.Y., 2015. Multiplex PCR for detection of the *Vibrio* genus and five pathogenic *Vibrio* species with primer sets designed using comparative genomics. *BMC Microbiol.* 2015; 15: 239
- Ransangan J., Mustafa S., 2009. Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass *Lates calcarifer* by use of 16S ribosomal DNA sequencing. *Journal of Aquatic Animal Health* 21, p150-155
- Ajdari A.; Ghorbanpour M.; Peyghan R.; Ahangarzadeh, M. and Mirbakhsh M., 2018. Investigation on *Vibrio harveyi* bacteria association in mortality of cultured Asian seabass (*Lates calcarifer*) in farm located in Iran Southern provinces with culture and PCR method. *Iranian Veterinary Journal*, Vol. 15, No. 4: 5-14.
- H.T.Dong, S. Taengphu, P. Sangsuriya, W. Charoensapsri, K.Phiwsaiya, T. Sornwatana, P.Khunrae, T. Rattanarajpong, S. Senapin, 2017. Recovery of *Vibrio harveyi* from scale drop and muscle necrosis disease in farmed barramundi, *Lates calcarifer* in Vietnam. *Aquaculture*, Volume 473, 20 April 2017, Pages 89-96
- Tendencia E.A., 2002. *Vibrio harveyi* isolated from cage-cultured seabass *Lates calcarifer* bloch in the Philippines. *Aquac. Res.* 33, 455-458
- S. Khouadja, F. Lamari, A. Bakhrouf, 2013. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during disease outbreaks. *International Aquatic Research* 2013, 5:13.

Ngày nhận 25-2-2021

Ngày phản biện 12-3-2021

Ngày đăng 1-5-2021