

ISSN 1859-4581

Tap chí

**NÔNG NGHIỆP
&
PHÁT TRIỂN
NÔNG THÔN**

*Science and Technology Journal
of Agriculture & Rural Development*

MINISTRY OF AGRICULTURE AND RURAL DEVELOPMENT, VIETNAM

THÀNH PHẦN VI KHUẨN VIBRIO TRÊN 2 LOÀI HẢI SÂM VÚ (*Holothuria nobilis*) VÀ HẢI SÂM LỤY (*Thelenota annanas*) BỊ BỆNH LỖ LOÉT TRONG ĐIỀU KIỆN NUÔI GIỮ

Nguyễn Văn Hùng¹, Nguyễn Thị Quế Chi¹, Dương Thị Phương¹

TÓM TẮT

Hải sâm là loài nuôi thủy sản có giá trị dinh dưỡng và kinh tế cao. Bên cạnh một số thành tựu đạt được trong sản xuất nhân tạo và nuôi thương phẩm, hải sâm cũng phải đối mặt với vấn đề bệnh. Bệnh lở loét được xem là một trong các bệnh nguy hiểm thường gặp nhất trên hải sâm nuôi. Nghiên cứu nay nhằm xác định thành phần vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ 2 loài hải sâm lựu (*Thelenota annanas*) và hải sâm vú (*Holothuria nobilis*) đang được nuôi phát dục, lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Nuôi biển Nha Trang - Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III (Khánh Hòa). Kết quả phân lập vi khuẩn trên 8 mẫu hải sâm (4 hải sâm lựu và 4 hải sâm vú) bị bệnh lở loét, thu được 11 loài vi khuẩn *Vibrio* spp. Kết quả định danh theo phương pháp truyền thống kết hợp phương pháp sinh học phân tử, dựa trên khuếch đại 2 gen 16S rARN và gen điều hòa độc tố *toxR*, đã xác định được 4 loài *Vibrio* chính. Đó là *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* và *Vibrio* sp.. Tần số bắt gặp của *V. alginolyticus* là 100% trên cả hai đối tượng hải sâm lựu và hải sâm vú. Đối với *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* và *Vibrio* sp. chỉ phát hiện với tần số bắt gặp là 25% trên hải sâm lựu và chưa phát hiện thấy trên hải sâm vú.

Từ khóa: Bệnh lở loét, gen 16S rADN, gen *toxR*, hải sâm lựu (*Thelenota annanas*), hải sâm vú (*Holothuria nobilis*), *Vibrio*.

1. BẬT VẤN ĐỀ

Hải sâm là loài động vật thuộc ngành da gai. Lớp hải sâm hiện nay có khoảng 1.100 loài, trong đó có khoảng hơn 20 loài có giá trị thực phẩm và y học đang được tập trung khai thác và nuôi thương phẩm (Đào Tấn Hổ, 2006)⁴. Trong đó, hải sâm vú được đánh giá là loài có giá trị thương mại cao. Ở vùng biển nước ta có khoảng 60 loài hải sâm, trong đó chủ yếu tập trung ở vùng biển Phú Yên, Khánh Hòa và các đảo xa bờ như Phú Quốc, Thổ Chu, Trường Sa, Côn Đảo... Mặc dù trữ lượng hải sâm khá phong phú và đa dạng nhưng do tình trạng khai thác quá mức dẫn đến nguồn lợi hải sâm suy giảm nghiêm trọng và có nguy cơ cạn kiệt (Đào Tấn Hổ, 1991)³. Theo FAO (2011), sản lượng khai thác tự nhiên trên thế giới tăng từ 4.300 tấn năm 1950 lên 23.400 tấn năm 2000, sau đó sản lượng hải sâm giảm mạnh còn gần 10.000 tấn vào năm 2010. Nhu cầu sử dụng hải sâm làm thực phẩm tăng mạnh và sự quản lý khai thác nguồn lợi không hợp lý chính là nguyên nhân của việc suy giảm nghiêm trọng nguồn lợi các loài hải sâm. Trước yêu cầu thực tiễn, nhiều nghiên cứu sinh sản nhân

tạo, ương nuôi ấu trùng và nuôi thương phẩm các loài hải sâm đã được chú trọng thực hiện. Ấn Độ là nước đầu tiên trên thế giới sản xuất nhân tạo thành công hải sâm cát *Holothuria scabra* do James thực hiện năm 1996. Nhìn chung, sinh sản nhân tạo hải sâm đã được thực hiện đối với một số loài có giá trị kinh tế cao như *H. scabra*, *H. fuscogilva*, *Actinopyga mauritiana* và *A. miliaris* (Nguyễn Đình Quang Duy et al., 2009)².

Cũng với sự phát triển nhân rộng mô hình nuôi, hải sâm bị một số bệnh trong quá trình nuôi, bệnh do ký sinh trùng, vi khuẩn,... gây ra. Cho đến nay, có rất ít công trình nghiên cứu về các bệnh ở hải sâm trên thế giới, ở Việt Nam chưa có công bố nào về bệnh ở nhóm đối tượng này. Tuy nhiên, qua tổng quan tài liệu có thể thấy bệnh lở loét là bệnh nguy hiểm thường gặp nhất ở hải sâm nuôi, bệnh có thể lây lan và gây chết với tỷ lệ lớn trong khoảng thời gian ngắn. Một số tác giả đã nghiên cứu về bệnh này như Becker và đồng tác giả (2003)⁵ nghiên cứu bệnh lở loét trên hải sâm cát *H. scabra*, Deng và đồng tác giả (2008)⁶, Li và đồng tác giả (2010)¹⁰ nghiên cứu bệnh lở loét ở loài hải sâm *Apostichopus japonicus* nuôi trong bể xi măng và ao đất. Nhìn chung, các

¹ Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III

nghiên cứu đã phân lập được một số nhóm vi khuẩn từ hải sâm bệnh lở loét như *Vibrio*, *Bacteroides*, *Photobacterium*, *Staphylococcus*,... Trong đó, *Vibrio* là nhóm tác nhân hiện diện thường xuyên và chiếm ưu thế trên các mẫu hải sâm bệnh lở loét. Chính vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định chính xác thành phần vi khuẩn *Vibrio* trên hai loài hải sâm vù *Holothuria nobilis* và hải sâm lựu *Thelenota annanas* bị bệnh lở loét trong điều kiện nuôi giữ. Kết quả của nghiên cứu sẽ là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu khả năng gây bệnh và đề xuất biện pháp phòng trị bệnh lở loét trên hai loài hải sâm này. Đã phát hiện 4 loài *Vibrio* ở hải sâm bị bệnh lở loét, nhưng khả năng, mức độ...gây bệnh của chúng thì cần tiếp tục được nghiên cứu cụ thể thì mới có thể đề ra biện pháp phòng trị.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 3 đến tháng 9 năm 2017 tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nuôi biển Nha Trang - Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III.

2.2. Vật liệu nghiên cứu

Hai loài hải sâm vù (*Holothuria nobilis*) và hải sâm lựu (*Thelenota annanas*) đang được nuôi phát dục tại Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển nuôi biển Nha Trang, thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Thu mẫu

Hải sâm có dấu hiệu đặc trưng, rõ ràng của bệnh lở loét sẽ được cách ly và lấy mẫu. Đồng thời, chọn hải sâm khỏe (không có dấu hiệu bệnh) để lấy mẫu đối chứng.

2.3.2. Phương pháp phân lập, nuôi cấy và thuần chủng vi khuẩn

Huyền dịch vi khuẩn tăng sinh trong TSB (Thymol Soy Broth, bổ sung 2% NaCl) được bổ sung glycerin 20%, lắc đều và chia nhỏ trong các eppendorf và lưu giữ ở tủ đông sâu -80°C sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

2.3.3. Phương pháp nghiên cứu đặc điểm sinh thái, sinh lý, sinh hóa vi khuẩn

Những loài có tần số bắt gặp (TSBG) cao và chiếm ưu thế được khảo sát đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hoá theo các bước như sau:

- Nhuộm Gram để quan sát hình thái vi khuẩn theo phương pháp của Plumb và Bowser (bản dịch của Nguyễn Ngọc Nhiên, 1992).

- Kiểm tra khả năng chịu đựng nồng độ muối của vi khuẩn ở 0%, 3%, 7% và 10%. Thử các phản ứng sinh hóa catalaza, oxylaza và khả năng nhạy cảm với Vibriostat (0/129) để bước đầu khẳng định vi khuẩn thuộc nhóm *Vibrio*.

- Thực hiện dãy phản ứng sinh hóa bằng test kit API 20E (BioMérieux- Pháp).

Định danh sơ bộ theo phương pháp truyền thống dựa vào khóa phân loại vi khuẩn của Bergey (1957) được giới thiệu bởi Holt và đồng tác giả (1994). Định danh theo phần mềm apiweb của nhà sản xuất Test kit API 20E (BioMérieux- Pháp).

2.3.4. Phương pháp định danh sinh học phân tử

- Tách chiết ADN vi khuẩn bằng bộ kit GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo, Mỹ).

Bảng 1. Trình tự các cặp mồi PCR

Gien	Trình tự oligonucleotit (5'-3')		Sản phẩm (bp)
16S rADN	27F	AGATTTGATCCTGGCTCAG	1.485
	1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	
ToxR	ToxRF	GATTAGGAAGCAACGAAAG	658
	ToxRR	GCAATCACTTCCACTGCTAAC	

30 chu kỳ gồm 94°C trong 30 giây, 50°C trong 30 giây và 72°C trong 1 phút.

- Đoạn gen *toxR* được khuếch đại bằng cặp mồi ToxRF và ToxRR (Xie *et al.*, 2005)¹⁶, sản phẩm PCR có kích thước khoảng 658 bp. Phản ứng PCR được tiến hành trong tổng thể tích 50 µL với vòng lặp 35 chu kỳ gồm 94°C trong 1 phút, 53°C trong 1 phút và 72°C trong 1 phút.

- Điện di sản phẩm PCR kèm theo thang chuẩn 1 Kb trên gel agarosa 1,5% trong dung dịch đệm TBE 1X ở 110 Volt trong 20 phút. Đọc kết quả điện di trên máy soi gel UV, kiểm tra sự có mặt của sản phẩm PCR tương ứng với kích thước trước khi gửi mẫu giải trình tự.

Dữ liệu trình tự thô sẽ được kết nối và phân tích nhờ phần mềm Sequencher 5.4.5 (Gene Codes-Anh). Các trình tự ADN của các chủng vi khuẩn và các trình tự tham chiếu có sẵn trên GenBank sẽ được

sử dụng cho việc phân tích trình tự trên NCBI (National Center for Biotechnology Information), sử dụng công cụ nucleotit - BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Tất cả các trình tự ADN sẽ được đóng hàng bằng cách sử dụng công cụ ClustalW và các khoảng trống (gap) được loại bỏ bằng phần mềm BioEdit 7.0.1.

Phân tích mối quan hệ phát sinh loài của các trình tự gen nghiên cứu cùng với các trình tự gen từ Genbank. Phép phân tích được tiến hành dựa trên thuật toán Neighbor Joining, sử dụng phần mềm MEGA 6 (Tamura *et al.*, 2013)¹³ với độ lặp lại 1.000 lần. Giá trị tin cậy (Bootstrap) được tính toán để xác định tính chính xác của thuật toán.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả phân lập vi khuẩn

Bảng 2. Đặc điểm khuẩn lạc (KL) của 11 chủng *Vibrio* spp.

STT	Kí hiệu	Đặc điểm khuẩn lạc	Vật chủ
1	Th.1	- Trên TSA: KL trắng đục, đường kính (đk) 2 mm - Trên TCBS: KL xanh đậm, mép tròn, lồi, đk 2 mm - Trên CHROMagar: KL tím, đk 2 mm	Hải sâm lựu bị bệnh lở loét
2	Th.2	- Trên TSA: KL trắng trong, đk 2 mm - Trên TCBS: KL xanh sáng, mép tròn, hơi lồi, đk 2 mm - Trên CHROMagar: KL trong suốt, đk 2 mm	Hải sâm lựu bị bệnh lở loét
3	Th.3	- Trên TSA: KL trắng đục đậm, tròn, lồi, bóng, đk 2 mm - Trên TCBS: KL vàng, mép tròn đều, lồi, bóng, đk 2,5 mm - Trên CHROMagar: KL trắng đục, đk 2 mm	Hải sâm lựu bị bệnh lở loét
4	Th.4	- Trên TSA: KL trắng đục, tròn, lồi, bóng, đk 2 mm - Trên TCBS: KL vàng, mép hơi răng cưa, dẹp, đk 2 mm - Trên CHROMagar: KL tím	Hải sâm lựu bị bệnh lở loét
5	Th.5	- Trên TCBS: KL vàng, bóng, tròn, hơi lồi, đk 1,5 mm - Trên CHROMagar: KL trắng đục	Hải sâm lựu bị bệnh lở loét
6	Th.6	- Trên TCBS: KL vàng/xanh lơ, bóng, tròn, đk 1 mm - Trên CHROMagar: KL trắng đục	Hải sâm lựu bị bệnh lở loét
7	Ho.1	- Trên TCBS: KL xanh nhạt (chuyển vàng), đk 1,5 mm, có tâm KL đậm, vùng xung quanh nhạt - Trên CHROMagar: KL màu trắng đục	Hải sâm vú bị bệnh lở loét
8	Ho.2	- Trên TCBS: KL xanh nhạt/ vàng, đk 1 mm, bóng, tròn - Trên CHROMagar: KL màu trắng trong	Hải sâm vú bị bệnh lở loét
9	Ho.3	- Trên TCBS: KL vàng, đk 1,5 mm, bóng tròn - Trên CHROMagar: KL màu trắng trong	Hải sâm vú bị bệnh lở loét
10	Ho.4	- Trên TCBS: KL vàng đậm, đk 3 mm, bóng, tròn, hơi dẹp, dính chặt trên bề mặt thạch - Trên CHROMagar: KL màu trắng đục	Hải sâm vú bị bệnh lở loét
11	Ho.5	- Trên TCBS: KL vàng, đk 1 mm, bóng tròn - Trên CHROMagar: KL màu trắng đục	Hải sâm vú bị bệnh lở loét

Nghiên cứu phân lập được 11 loài vi khuẩn *Vibrio* spp. trên 8 mẫu hải sâm bị bệnh lở loét (4 mẫu hải sâm lựu *Thelenota annanas* và 4 mẫu hải sâm vú *Holothuria nobilis*).

Đặc điểm hình thái, kích thước, màu sắc khuẩn lạc của 11 chủng *Vibrio* spp. được thể hiện ở bảng 2.

3.2. Kết quả định danh sinh hóa

Kết quả sinh hóa của 11 chủng vi khuẩn phân lập đều mang đặc điểm đặc trưng của chi *Vibrio*. Chúng đều là Gram âm, có khả năng di động, phản ứng catalaza và oxidaza dương tính, phản ứng ure âm tính, không có khả năng sinh H₂S và nhạy với Vibriostat 2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridin photphat (0/129). Ngoài ra, các đặc điểm sinh hóa khác của 11 chủng được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Đặc điểm sinh hóa của 11 chủng *Vibrio* spp.

Phản ứng sinh hóa	Th.1	Th.2	Th.3	Th.4	Th.5	Th.6	Ho.1	Ho.2	Ho.3	Ho.4	Ho.5
Phát sáng	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-
ONPG	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
GEL	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
SOR	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
SAC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AMY	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
ARA	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
NO ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kết quả định danh sơ bộ	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i> / <i>V. campbellii</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>Vibrio</i> sp.	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i> / <i>Vibrio</i> sp.	<i>V. alginolyticus</i> / <i>Vibrio</i> sp.	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>

với khuẩn lạc trắng đục trên CHROMagar. Các chủng vi khuẩn còn lại, việc định danh sơ bộ chỉ dừng lại ở chi *Vibrio* và sẽ được định danh chính xác hơn bằng phương pháp sinh học phân tử.

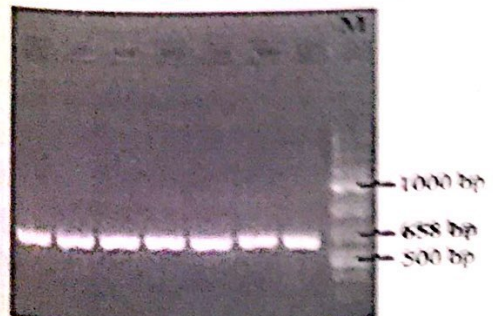
Chatterjee và Halder (2012)⁷ cho rằng *Vibrio* spp. có tính đa hình cao và hệ thống định danh khá phức tạp nên nếu chỉ dựa vào đặc điểm sinh học thì khó có thể định danh chính xác đến loài. Chính vì vậy, gen mã hóa 16S rARN và một số gen báo tần khác được sử dụng rộng rãi trong định danh *Vibrio* ở mức độ sinh học phân tử. Nghiên cứu này sử dụng gen 16S rARN và gen điều hòa độc tố *toxR* để định danh đến loài.

3.3. Định danh vi khuẩn bằng phương pháp sinh học phân tử

ADN tổng số của vi khuẩn được kiểm tra mức độ tinh sạch trên gel điện di agarosa 1,5% cùng với thang chuẩn 1 Kb và ADN tổng số của 11 loài đều có kích thước lớn hơn 10.000 bp. Các mẫu ADN được dùng trong phản ứng khuếch đại 2 gen 16S rADN và *toxR* bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Hình ảnh điện di kết quả PCR khuếch đại 2 gen mục tiêu thể hiện ở hình 1 và 2.



Hình 1. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen 16S rADN (M: marker 1 kb)



Hình 2. Điện di sản phẩm PCR khuếch đại gen *toxR* (M: Marker 100 bp)

Kết quả so sánh trình tự gen 16S rADN của 11 loài vi khuẩn *Vibrio* với các trình tự trên Genbank chia chúng thành 4 nhóm. Nhóm 1, loài Th.1, tương đồng với các loài *V. parahaemolyticus*. Nhóm 2, loài Th.2, tương đồng với các loài *V. harveyi*. Nhóm 3,

loài Th.3, tương đồng với các loài *V. alginolyticus*. Nhóm 4, loài Th.4, tương đồng với các chủng *Vibrio* sp.. Các phép truy vấn trình tự đều có các chỉ số đánh giá: Query cover: 98 - 99%, E value: 0, Ident: 99 - 100%. Kết quả đồng trình tự của 4 nhóm *Vibrio* cho thấy trình tự đoạn gen 16S rADN của chúng có mức độ tương đồng khá cao, có thể lên đến 98% và điều này đã được một số tác giả ghi nhận trước đó (Kim *et al.* (1999), Xie *et al.* (2005)¹⁰, Mustapha *et al.* (2012)¹¹, Gargouti *et al.* (2015)⁹). Tuy nhiên, giữa 4 nhóm có 9 vị trí nucleotit khác nhau trong tổng số 1424 nucleotit/trình tự. Tại vị trí nucleotit thứ 1009, có sự khác nhau giữa các loài trong cùng một loài ở nhóm *V. alginolyticus*. Sự khác nhau ở nucleotit T hoặc G và xảy ra cả trên loài tham khảo từ Genbank.

Kết quả so sánh về tỷ lệ % sai khác giữa các nhóm và các loài trong cùng một nhóm như sau: tỷ lệ này rất thấp (0,1%) hoặc không có sự sai khác (0%) giữa các loài trong cùng một nhóm; trong khi tỷ lệ % sai khác giữa các nhóm cao hơn, dao động từ 0,3 đến 0,8% trong đó, giữa 2 nhóm *V. parahaemolyticus* và *V. alginolyticus* có tỷ lệ % sai khác tương đối thấp (0,3 - 0,4%) cho thấy mức độ tương đồng về trình tự gen 16S rADN khá cao ở hai nhóm vi khuẩn này. Kết quả này tương tự với kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Quê Chi và đồng tác giả (2017)¹. Nhóm tác giả đã thực hiện nghiên cứu tương tự trên các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp., được phân lập từ ấu trùng của hoàng đế (*Ranina ranina*) bị bệnh phát sang, kết quả so sánh về tỷ lệ % sai khác giữa các chủng *Vibrio* spp. trong cùng nhóm cũng 0 - 0,1% và giữa các nhóm với nhau là 0,5 - 0,8 %. Vì 16S rADN là đoạn gen có tính bảo tồn rất cao ở tất cả các tế bào, vì vậy, với các tỷ lệ % sai khác như vậy hoàn toàn đủ cơ sở để phân loại các chủng *Vibrio* spp..

Tương tự vậy, kết quả so sánh trình tự gen *toxR* của 11 loài vi khuẩn nghiên cứu với các loài tham khảo trên Genbank cũng chia chúng thành 4 nhóm: *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* và chủng *Vibrio* sp.. Tuy nhiên, tỷ lệ sai khác về trình tự gen *toxR* giữa các nhóm (21,3 - 28,9 %) và giữa các loài trong cùng nhóm (0 - 3,9%) cao hơn nhiều so với trình tự gen 16S rADN. Điều đó một lần nữa cho thấy mức độ bảo tồn cao hơn ở gen 16S rADN vi khuẩn. Tỷ lệ % sai khác về trình tự gen *toxR* giữa các loài vi khuẩn được thể hiện qua bảng 4.

Xây dựng cây phát sinh loài của các chủng *Vibrio* spp. bằng phần mềm MEGA 6 (Tamura *et al.*,

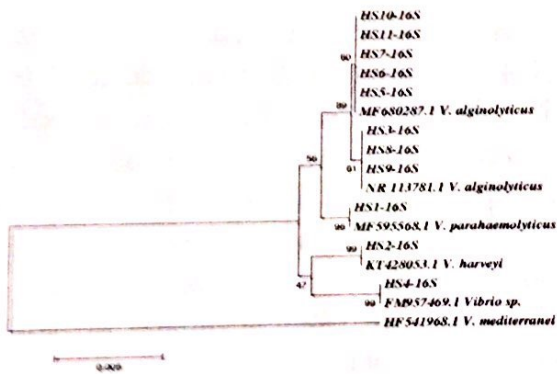
2013) [1], dựa trên trình tự gen 16S rADN và gen *toxR* lần lượt được thể hiện ở hình 3 và 4 với giá trị bootstrap được hiển thị trên các nhánh. Trong đó, 2

trình tự gen 16S rADN (HF5419968.1) và gen *toxR* (EU727207.1) của vi khuẩn *V. mediterranei* được dùng làm nhóm ngoại.

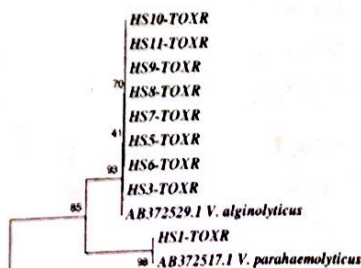
Bảng 4. Tỷ lệ % sai khác về trình tự gen *toxR*

Loại		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
HS1	1	-													
V.p GB	2	0,9	-												
HS3	3	26,3	26,1	-											
V.h GB	4	28,9	28,4	3,1	-										
HS5	5	18,2	18,7	25,2	27,6	-									
HS6	6	18,5	19	25,7	28,1	0,7	-								
HS7	7	18,4	18,9	25,5	27,9	0,5	0,2	-							
HS8	8	18,4	18,9	25,5	27,9	0,5	0,2	0,2	-						
HS9	9	18,5	19	25,7	27,9	0,7	0,4	0,2	0,2	-					
HS10	10	18,4	19	25,5	27,9	0,5	0,2	0	0	0,2	-				
HS11	11	18,5	18,7	25,3	27,8	0,7	0,4	0,2	0,2	0,4	0,2	-			
V.a GB	12	18,4	18,9	25,5	27,9	0,5	0,2	0	0	0,2	0	0,2	-		
HS13	13	18,4	18,2	25	27,4	0,9	1,2	1,0	1,0	1,2	1,0	0,9	1,0	-	
HS4	14	25,8	25,3	21,3	22,4	26,3	26,6	26,5	26,5	26,3	26,5	26,3	26,5	25,8	-
V.s GB	15	26,1	25,3	21,3	22,1	26,5	26,5	26,3	26,3	26,1	26,3	26,1	26,3	25,8	3,9

Ghi chú: V.p GB (*V. parahaemolyticus* AB372517.1), V.h GB (*V. harveyi* DQ503438.1), V.a GB (*V. alginolyticus* AB372529.1), V.s GB (chủng *Vibrio* sp. AY260170.1)



Hình 3. Cây phát sinh loài của các chủng *Vibrio* spp. dựa vào trình tự gen 16S rADN



Bảng 5. Kết quả định danh và TSBG của các chủng *Vibrio* spp.

STT	Ký hiệu loài	Kết quả định danh	TSBG (%)	
			Hải sản lượ	Hải sản vù
1	HS1	<i>V. parahaemolyticus</i>	25	0
2	HS2	<i>V. harveyi</i>	25	0
3	HS3	<i>V. alginolyticus</i>	100	100
4	HS5			
5	HS6			
6	HS7			
7	HS8			
8	HS9			
9	HS10			
10	HS11			
11	HS4	<i>Vibrio</i> sp.	25	0

Kết quả định danh cho thấy loài vi khuẩn

lở loét tại các trại giống ở Madagascar. Kết quả định danh cho thấy chúng thuộc chủng *Vibrio* và một số đã được định danh là *V. harveyi* và *V. alginolyticus*. Tác giả còn cho biết, bệnh lở loét này đã xảy ra trên hải sâm *Apostichopus japonicus* ở Trung Quốc, hải sâm *Isotichopus fuscus* ở Ecuador và hải sâm cát *H. Scabra* ở Australia và New Caledonia. Bên cạnh đó, Wang et al. (2004)¹⁴ cho rằng nguyên nhân gây tử vong cao trên hải sâm nuôi trong giai đoạn 2001 - 2004 là do các bệnh thối rữa - lở loét trên thân và tác nhân là các loài vi khuẩn thuộc chủng *Vibrio*. Gần đây, Li et al. (2010) tiến hành nghiên cứu trên hải sâm *Apostichopus japonicus* bị bệnh lở loét thân, sưng phồng miệng gây tử vong cao. Nghiên cứu cũng đã định danh sinh hóa và sinh học phân tử sử dụng gen 16S rARN đối với các loài vi khuẩn phân lập được, kết quả, ngoài nhóm vi khuẩn *Vibrio* chiếm tỷ lệ cao nhất (64,5%) thì một số nhóm vi khuẩn khác cũng đã được tìm thấy là *Shewanella* (12,9%), *Serratia* (12,9%), *Pseudoalteromonas* (6,4%) và *Flavobacterium* (3,2%). Trong đó, các loài *V. splendidus* chiếm ưu thế trong các mẫu phân lập. Đồng thời, nghiên cứu cũng đã xác định độc lực của một số loài vi khuẩn và cho kết quả độc lực tăng lên theo thứ tự các loài *P. tetraodonis*, *V. splendidus* và *Shewanella* sp. (LD₅₀ lần lượt là 7,24 x 10⁷, 1,74 x 10⁷, 7,76 x 10⁶ cfu/g trọng lượng hải sâm).

Tuy nhiên, không chỉ trên hải sâm, chủng *Vibrio* cũng được xác định là tác nhân chính gây bệnh xuất huyết, lở loét trên một số đối tượng thủy sản khác như cá hồi (*Oncorhynchus* spp.), cá tráp (*Sparus aurata*), cá chêm châu Âu (*Dicentrarchus labrax*), cá bơn (*Scophthalmus maximus*),... Ở họ cá mú, chủng *Vibrio* thường gây bệnh trên các loài như cá mú chấm nâu, cá mú đen, cá mú chấm cam và cá mú mè, làm thiệt hại kinh tế cho nghề nuôi cá mú ở Brunei, Darussalam, Malaysia, Đài Loan, Hồng Kông, Indonesia, Kuwait, Singapore, Philippin và Thái Lan. Tác nhân gây bệnh thuộc chủng *Vibrio* thường là *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. vulnificus* và *V. carchariae* (Nash và cộng sự, 1987)¹².

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Kết quả định danh vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ hải sâm...

Vibrio phân lập được 4 loài *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* và *Vibrio* sp. với TSBG của *V. alginolyticus* là 100% trên cả hai đối tượng hải sâm lợ và hải sâm vù. Đối với *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* và chủng *Vibrio* sp. chỉ phát hiện với TSBG 25% trên hải sâm lợ và chưa phát hiện thấy trên hải sâm vù.

Từ kết quả nghiên cứu trên cùng với một số nghiên cứu trước đó về bệnh lở loét trên hải sâm do *Vibrio* gây ra thì vi khuẩn *Vibrio* có thể là tác nhân sơ cấp hoặc tác nhân thứ cấp (tác nhân cơ hội) trong bệnh này. Việc phân lập chủng *Vibrio* từ mẫu bệnh không khó nhưng xác định vai trò của chúng khi có dịch bệnh không đơn giản. Chính vì vậy cần thực hiện thêm một số nghiên cứu bệnh khác để xác định chính xác tác nhân gây bệnh lở loét trên hải sâm và đề xuất các phương pháp phòng, trị hiệu quả.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Thị Quế Chi, Đặng Thúy Bình và Nguyễn Thị Thanh Thủy (2017). Thành phần vi khuẩn *Vibrio* phân lập trên ấu trùng cua hoàng đế (*Ranina ranina* Linnaeus, 1785) bị bệnh phát sáng. Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, kỳ 1, tháng 3, tr. 98-107.
2. Nguyễn Đình Quang Duy (2009). Nghiên cứu xây dựng quy trình công nghệ nuôi thương phẩm hải sâm cát *Holothuria scabra* trong ao ở quy mô sản xuất tại một số tỉnh duyên hải Nam Trung bộ. Báo cáo tổng kết đề tài cấp Bộ. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III.
3. Đào Tấn Hồ (1991). Nguồn lợi hải sâm (Holothuroidea) ở vùng biển phía Nam Việt Nam. Tuyển tập báo cáo khoa học - Hội nghị khoa học toàn quốc về biển lần III, tập 1, tr. 112-118.
4. Đào Tấn Hồ (2006). Đặc điểm hình thái các loài hải sâm có giá trị thương mại ở biển Việt Nam. Tạp chí Khoa học và Công nghệ biển, số 2, tr. 70-89.
5. Alsina M. and Blanch A. R. (1994). A set of key for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J. Appl. Bacteriol. 76: 79-85.
6. Becker P., Gillan D., Lanterbecq D., Jangoux M., Rasolofonirina R., Rakotovo J., Eeckhaut I. (2003). The skin ulceration disease in cultivated *Holothuria scabra* (Holothuroidea,

rapid and accurate identification methods. *J. Marine Sci. Res. Dev.* S1.

8. Deng H., Zhou Z., Wang N. and Liu C. (2008). The syndrome of sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) infected by virus and bacteria. *Virologica Sinica* 2008, 23 (1): 63-67.

9. Gargouti A. S., Ab-Rashid M. N. K., Ghazali M. F., Mitsuaki N., Hareh K. K. and Radu S. (2015). Detection of *tdh* and *trh* toxic genes in *Vibrio alginolyticus* strain from mantis shrimp (*Oratosquilla oratoria*). *J. Nutr. Food Sci.* 2015, 5:5.

10. Li H., Qiao G., Gu J. Q., Zhou W., Li Q., Woo S. H., Xu D. H., Park S. I. (2010). Phenotypic and genetic characterization of bacteria isolated from diseased cultured sea cucumber *Apostichopus japonicus* in northeastern China. *Dis. Aquat. Org.* Vol. 91: 223-235.

11. Mustapha S., Mustapha E.M., Brahim B. and Nozha C. (2012). Characterization of *Vibrio alginolyticus trh* positive from Mediterranean environment of Tamouda bay (Morocco). *World Environment* 2012, 2(4): 76-80.

12. Nash, G., Aderson, I. G., Shariff, M. and Shamsudin, M. N. (1987). Bacteriosis associated with

epizootic in the giant sea perch, *Lates calcarifer* and the estuarine grouper. *Epinephelus tauvina*, cage cultured in Malaysia. *Aquaculture* (67), pp. 105-111.

13. Tamura, K., Stecher, G. Peterson, D. Filipski, A. Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 30, pp. 2725-2729.

14. Wang Y. G., Zhang C. Y., Rong X. J., Chen J. I., Shi C. Y., Sun H. L. and Yan J. P. (2004). Diseases of cultured sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) in China. p. 297-310. In: Lovatelli A., Conand C., Purcell S., Uthicke S., Hamel J.-F. and Mercier A. (eds). *Advances in sea cucumber aquaculture and management*. FAO Fisheries Technical Report No. 463, FAO, Rome. 425 p.

15. Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. and Lane, D. J., 1991. 16S ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Int. J. Bacteriol.* Vol. 173, no. 2, pp. 679-703.

16. Xie Z. Y., Hu C. Q., Chen C., Zhang L. P. and Ren C. H. (2005). Investigation of seven *Vibrio* virulence genes among *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus* strain from the coastal mariculture system in Guangdong, China. *Lett. Appl. Microbiol.* 41:201-207.

COMPOSITION OF *Vibrio* ISOLATED FROM TWO SPECIES OF SEA CUCUMBERS *Holothuria nobilis* AND *Thelenota annanas* WITH SKIN ULCERATION DISEASE IN CAPTIVE CONDITION

Nguyen Van Hung, Nguyen Thi Que Chi, Duong Thi Phuong
Summary

Sea cucumbers are high nutrition and economic aquaculture species value. In addition to some of the achievement in artificially produced and grow-out, sea cucumbers also face the problem of disease. Skin ulceration is considered one of the most dangerous diseases on sea cucumbers. This study aimed to identify *Vibrio* species, isolated from two species of sea cucumbers (*Thelenota annanas* and *Holothuria nobilis*), being stored at Nha Trang Mariculture Research and Development Center - Research Institute for Aquaculture No.3 (Khanh Hoa). Results of bacteriological isolation on eight samples of sea cucumbers (four *Thelenota annanas* and four *Holothuria nobilis*), with skin ulceration disease, obtained 11 isolates strains that were belong to *Vibrio* spp. Traditional identification methods combine with molecular biology methods based on 16S rDNA gene and *toxR* gene amplification, have identified four main species of bacteria including *Vibrio parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *Vibrio* sp.. The frequency caught of *V. alginolyticus* is 100% on both sea cucumbers *Thelenota annanas* and *Holothuria nobilis*. For *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* and *Vibrio* sp., only detected with a frequency...