

## SO SÁNH CẤU TRÚC HỆ VI KHUẨN ĐƯỜNG RUỘT CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*LITOPENAEUS VANNAMEI*) GIỮA TÔM KHOẺ MẠNH VÀ TÔM BỊ BỆNH TẠI SÓC TRĂNG, VIỆT NAM

Trần Trung Thành<sup>1,2,3</sup>, Nathan Bott<sup>2</sup>, Lê Hoàng Đức<sup>1,3</sup>, Đặng Thị Hoàng Oanh<sup>4</sup>, Nguyễn Trung Nam<sup>1,3</sup>, Chu Hoàng Hà<sup>1,3,✉</sup>

<sup>1</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Đại học RMIT, Australia

<sup>3</sup>Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>4</sup>Đại học Cần Thơ

✉ Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: chuhoangha@ibt.ac.vn

Ngày nhận bài: 10.9.2018

Ngày nhận đăng: 25.9.2018

### TÓM TẮT

Hệ vi khuẩn đường ruột là một hệ sinh thái phức tạp có liên quan tới nhiều chức năng của cơ thể vật chủ. Sự ổn định của hệ vi khuẩn đường ruột đóng góp vào sự ổn định về sức khỏe và sức đề kháng của vật chủ. Nhiều nghiên cứu đã được xây dựng để tìm hiểu hệ vi khuẩn đường ruột dựa trên các phương pháp nuôi cấy và điện di biến tính truyền thống nhưng chưa đem lại hiệu quả. Nhằm khắc phục những hạn chế còn tồn tại, phương pháp giải trình tự thế hệ mới dựa trên vùng gen 16S rRNA (Metabarcoding) đã được phát triển. Từ kết quả so sánh trình tự gen 16S rRNA của các mẫu ruột tôm thu được tại các đầm nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) và nhóm đối chứng là một mẫu ruột tôm thu tại đầm nuôi tôm sú (*Penaeus monodon*) (ST-PM) và một mẫu mô cơ của tôm thẻ chân trắng (Mô cơ) với ngân hàng cơ sở dữ liệu (16S rRNA) Green genes, thành phần vi khuẩn trong ruột tôm các đầm nuôi tôm thẻ chân trắng đã được làm sáng tỏ. Các ngành chiếm ưu thế bao gồm Proteobacteria (49,3–57,4%), Firmicutes (15,6–34,4%), Bacteroidetes (0,1–16,9%) trên tổng số toàn bộ các ngành có trong các mẫu ruột tôm thẻ chân trắng nghiên cứu. *Rhizobium* (0,4–26,1%), *Vibrio* (0–22,3%), *Spongiimonas* (0–16,7%) là các chi chiếm ưu thế trong ruột tôm thẻ chân trắng. Nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, ở mức độ ngành, Fusobacterium (10%) là ngành được xếp vào nhóm tác nhân gây bệnh đã được tìm thấy chủ yếu trong mẫu ruột tôm ở đầm nuôi tôm thẻ chân trắng bị bệnh (ST4) so với hai mẫu ruột tôm thẻ chân trắng trong đầm tôm sinh trưởng kém (ST3) (0%) và đầm tôm thẻ chân trắng sinh trưởng bình thường (ST1) (0,6%). So sánh thành phần các chi cũng đã chỉ ra rằng chi *Vibrio* là chi được xếp vào nhóm tác nhân gây bệnh trên tôm đã được tìm thấy chủ yếu trong mẫu ruột tôm ST4 (22,3%) so với mẫu ruột tôm ST3 (2,4%) và ST1 (3,5%). Ở mức độ loài sự khác biệt đáng kể nhất được chỉ ra là *Vibrio rotiferianus*, tác nhân gây bệnh này được tìm thấy nhiều hơn đáng kể trong mẫu ruột tôm ST4 (7,98%) so với mẫu ST3 (1%) và mẫu ST1 (0%). Giới Fusobacterium và chi *Vibrio* được gợi ý sẽ là đối tượng quan tâm trong nghiên cứu chi tiết các tác nhân gây bệnh trên tôm tiếp theo.

**Từ khóa:** *Litopenaeus vannamei*, metabarcoding, Fusobacterium, thành phần vi khuẩn đường ruột tôm, *Vibrio*

### GIỚI THIỆU

Hệ vi khuẩn đường ruột là một hệ sinh thái phức tạp với nhiều chức năng đối với vật chủ (Al-Harbi, Uddin, 2005; Ramírez, Romero, 2017). Sự ổn định của hệ vi khuẩn đường ruột ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và sức khỏe của hệ miễn dịch (Ravel *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2010). Ngược lại, trong quá trình phát triển của sinh vật chủ, hệ vi khuẩn đường ruột cũng chịu sự tác động dẫn tới thay đổi cấu trúc về

thành phần và mức độ đa dạng theo độ tuổi của vật chủ (Fraune, Bosch, 2010; Li *et al.*, 2017). Do đó, nỗ lực khám phá thành phần và mức độ đa dạng của các hệ vi khuẩn đường ruột là cần thiết để có thể hiểu được mối liên hệ cũng như sự tương tác giữa hệ vi khuẩn đường ruột với sức khỏe, sức sinh trưởng cũng như trong các giai đoạn phát triển khác nhau của vật chủ.

Tôm thẻ chân trắng, *Litopenaeus vannamei*, là một trong số những sản phẩm đem lại hiệu quả kinh

tế cao nhất trong ngành thủy sản. Theo con số thống kê của Hiệp hội chế biến và xuất khẩu thủy sản Việt Nam, trong năm 2017 tổng giá trị xuất khẩu của tôm thẻ chân trắng là 2,5 tỷ USD tăng 29,2% so với năm 2016 và dự kiến sẽ tăng trong năm 2018 (VASEP, 2018). Theo kết quả thống kê của tổng cục thủy sản trong 5 tháng đầu năm 2017, 14,5% diện tích nuôi tôm trên cả nước bị bệnh đốm trắng (1.656,2 ha). Thiệt hại ghi nhận được với bệnh hoại tử gan tụy là 1.557 ha diện tích bị bệnh, chiếm khoảng 13,6%. Ngoài ra, một số bệnh khác cũng đã phát sinh như đỏ thân, bệnh còi, bệnh phân trắng cũng đã gây thiệt hại trên các diện tích nuôi trồng tôm thẻ chân trắng (Tổng cục thủy sản, 2017).

Trên thế giới một số nghiên cứu đã được tiến hành trên đối tượng là hệ vi khuẩn đường ruột trong tôm thẻ chân trắng. Thành phần vi khuẩn đã được làm sáng tỏ bởi nhiều nhóm nghiên cứu (Qiao *et al.*, 2017; Suo *et al.*, 2017; Tzuc *et al.*, 2014; M. Zhang *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016), trong đó có sự thay đổi về thành phần vi khuẩn trong ruột tôm qua các giai đoạn sinh trưởng (Huang *et al.*, 2014) và so sánh về thành phần vi khuẩn giữa mẫu ruột tôm bệnh và tôm thường (Yang *et al.*, 2016). Kết quả của các nghiên cứu đã chỉ ra sự biến động, thay đổi về trật tự sắp xếp của các nhóm chiếm ưu thế.

Bên cạnh đó, rất nhiều các phương pháp đã được áp dụng trong nghiên cứu về thành phần hệ vi khuẩn như thư viện tạo dòng phân tử (Wu *et al.*, 2010) và phương pháp điện di biến tính (PCR-DGGE) (Dhanasiri *et al.*, 2011). Tuy nhiên các phương pháp này đã cho thấy nhược điểm về khả năng đánh giá tổng thể thành phần một hệ vi khuẩn (Qin *et al.*, 2016). Trên cơ sở đó phương pháp giải trình tự thế hệ mới đã được phát triển để khắc phục những

nhược điểm của phương pháp truyền thống trong việc nghiên cứu đồng thời các hệ vi khuẩn phức tạp dựa trên vùng gen 16S rRNA (Glenn, 2011; Sun *et al.*, 2014).

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá thành phần vi khuẩn trong ruột tôm thẻ chân trắng ba tháng tuổi giữa các đầm nuôi tôm bị bệnh, đầm nuôi tôm sinh trưởng kém và đầm nuôi tôm khỏe mạnh. Kết quả của nghiên cứu này sẽ giúp dự đoán một số tác nhân có khả năng gây bệnh trên tôm thẻ chân trắng.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Mẫu tôm thẻ chân trắng nuôi tại các đầm nuôi bán thâm canh, là mẫu tôm tại 3 đầm nuôi 3 tháng tuổi được thu tại xã Lịch Hội Thượng (huyện Trần Đề, tỉnh Sóc Trăng) vào tháng 11 năm 2015 bao gồm: đầm nuôi bị bệnh chưa rõ nguyên nhân (ST4), đầm nuôi tôm sinh trưởng kém (ST3), và đầm nuôi tôm khỏe mạnh (ST1) (Bảng 1). Các mẫu được thu là một mẫu mô cơ tôm thẻ chân trắng (chọn làm out-group) và một mẫu ruột từ đầm nuôi tôm sú được lựa chọn để làm đối chứng. Mẫu mô cơ được cắt từ một cá thể tôm thẻ chân trắng sử dụng dao mổ vô trùng và được bảo quản ở  $-80^{\circ}\text{C}$  tới khi sử dụng. Toàn bộ phần cặn và dịch trong ruột tôm được tách từ 30 cá thể tôm thẻ chân trắng lấy ngẫu nhiên trong đầm nuôi sử dụng dao mổ vô trùng. Các mẫu sau đó được đặt trong ống Effendorf, giữ trong đá khô lạnh trước khi được bảo quản trong tủ lạnh  $-80^{\circ}\text{C}$  cho tới khi sử dụng, phần ruột tôm được loại bỏ để tránh nhiễm DNA của tôm thẻ chân trắng.

**Bảng 1.** Vị trí lấy mẫu.

	ST1	ST3	ST4	ST-PM
GPS	9°25'11.3"N 106°08'11.3"E	9°25'06.8"N 106°08'09.6"E	9°25'08.8"N 106°08'05.2"E	9°25'11.7"N 106°08'16.2"E

### Phương pháp

DNA tổng số được tách từ mô cơ sử dụng bộ kit QIAmp DNA Mini Kit của hãng QIAGEN (Đức). Bộ kit PowerSoil DNA Isolation của hãng MoBio (Đức) được sử dụng để tách tổng số từ phần dịch ruột tôm thẻ chân trắng. Các mẫu DNA sau đó được sử dụng làm khuôn để giải trình tự gen 16S rRNA. Cặp  
mũi  
xuôi  
5'  
TCGTCCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAAGAGAC  
AGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' và ngược = 5'

GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAAGAGA  
CAGGACTACHVGGGTATCTAAT CC-3' được sử dụng để khuếch đại đoạn V3-V4 của gen 16S. Các đoạn trình tự V3 V4 của gen 16S rRNA được giải trình tự trên hệ thống máy giải trình tự thế hệ mới Miseq của Illumina (2 x 250 paired end) tại công ty Macrogen (Hàn Quốc). Sau khi giải trình tự các đoạn đọc được xử lý để loại bỏ các vùng đánh dấu (index, barcodes), mũi (primers) thực hiện bởi công ty Macrogen. Các nucleotide có điểm chất lượng Phred nhỏ hơn 25 bị loại bỏ thông qua công cụ

Trimmomatic phiên bản 0.38. Các đoạn đọc có chất lượng tốt sau được phân tích bằng công cụ GHAP Amplicon pipeline (CSIRO, Australia). Các đoạn trình tự sau khi được nối có kích thước từ 260 bp tới 480 bp được lựa chọn để thực hiện các bước phân loại tiếp theo. GHAP Amplicon pipeline được phát triển dựa trên công cụ Usearch và RDP classifier. Cơ sở dữ liệu Green genes được sử dụng để phân loại các nhóm OTU. Tiếp sau đó công cụ QIIME được sử dụng để phân tích các giá trị alpha và beta diversity với giá trị tham số sequence depth là 20000 trên một mẫu với độ lặp lại trong mỗi phân tích là 1000 lần. Để đánh giá sự khác biệt về giá trị của kết quả phân tích alpha diversity, Welch's t test được sử dụng với độ tin cậy là 95% ( $\alpha = 0.05$ ).

## KẾT QUẢ

### Phân tích thống kê

Kết quả phân tích vùng V3 V4 của gen 16S rRNA cho thấy: tổng số 889.245 trình tự có độ tin cậy cao, trong đó 99,9853% thuộc về các nhóm vi khuẩn (Bacteria) và 0,0139% thuộc về nhóm vi khuẩn cổ (Archaea). Phần còn lại chiếm 0,0008% là dữ liệu không thuộc cơ sở dữ liệu (Unclassified). Đơn vị phân loại tiêu chuẩn (OTU) trong nghiên cứu này được phân theo mức độ tương đồng 97%. Phân tích Welch's t test đã chỉ ra rằng sự khác biệt của các giá trị alpha diversity metrics giữa các mẫu là đáng kể. Các giá trị p-

value từ phân tích Welch's t test giữa các cặp mẫu đều cho giá trị lớn hơn 0,05 ( $\alpha = 0.05$ ).

### Phân tích alpha và beta diversity

Trong phân tích alpha diversity (Bảng 2), giá trị thể hiện sự phong phú của quần thể vi khuẩn được thể hiện qua giá trị Observed OTUs. So sánh giá trị Observed OTUs cho thấy mẫu ruột ở đầm nuôi tôm sú có số lượng OTUs phong phú nhất (514) trong khi mẫu mô cơ có số lượng OTUs thấp nhất là 343. Giá trị ước lượng số lượng loài còn được thể hiện bởi các giá trị Ace và Chao1. Kết quả phân tích alpha diversity cho thấy giá trị Ace và Chao1 của các mẫu tỉ lệ thuận với giá trị Observed OTUs ( $p < 0.05$ ), giá trị Ace và Chao1 cao nhất thuộc về mẫu ruột tôm sú (855,30 và 860,31 tương ứng) trong khi mẫu có giá trị Ace và Chao1 thấp nhất thuộc về mẫu mô cơ (513,76 và 605,13 tương ứng). Mẫu tôm khoẻ mạnh ST1 cho số lượng loài được dự đoán (Ace = 849) cao hơn so với mẫu tôm bệnh ST4 (Ace = 647). Trong tất cả các mẫu, giá trị Ace và Chao1 luôn cao hơn giá trị Observed OTUs, điều này có nghĩa nếu số lượng các trình tự tăng lên thì số lượng các loài được dự đoán sẽ tăng lên. Kết quả trong phân tích alpha diversity cũng chỉ ra rằng sự khác nhau về giá trị Shannon và Simpson là đáng kể. Giá trị cao nhất của Shannon và Simpson thuộc về mẫu ruột từ đầm nuôi tôm sú (4,93 và 0,91 tương ứng) trong khi giá trị thấp nhất của hai tham số này thuộc về mẫu mô cơ (3,76 và 0,85 tương ứng).

**Bảng 2.** Kết quả phân tích alpha diversity từ các mẫu nghiên cứu.

	Ace	Chao1	Observed OTUs	Shannon	Simpson
Mô cơ	513,76	605,13	343,00	3,76	0,85
ST1	849,83	854,65	448,00	4,11	0,81
ST3	832,37	843,15	397,00	4,31	0,88
ST4	647,51	659,51	357,00	4,39	0,89
STPM	855,30	860,31	514,00	4,93	0,91

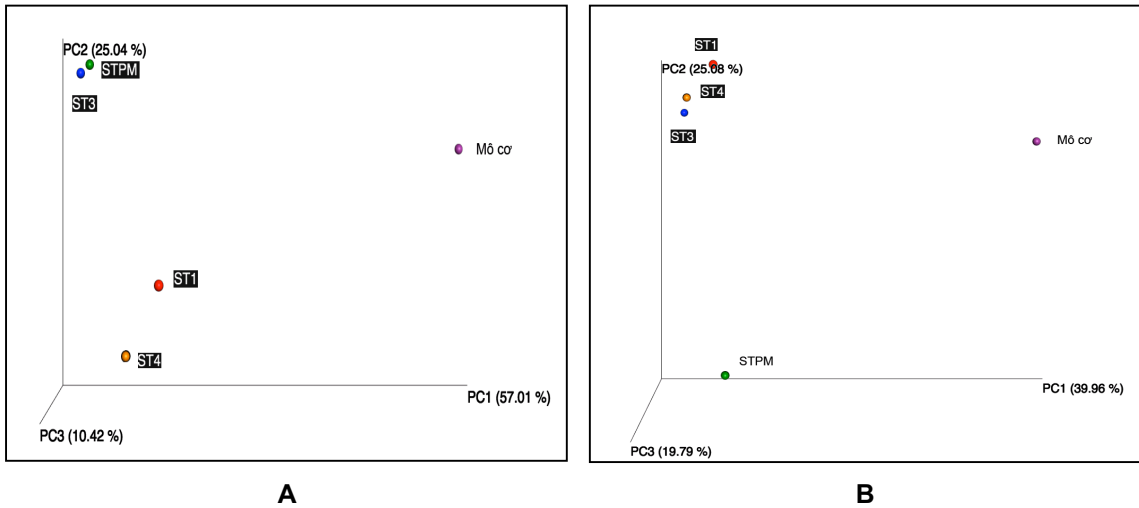
Trong phân tích beta diversity, phân tích Principal component analysis (PCA) dựa trên weighted và unweighted UniFrac distances (Hình 1) đã chỉ ra rằng các mẫu ruột từ đầm nuôi tôm thẻ chân trắng tạo thành một nhóm có sự khác biệt so với hai mẫu còn lại bao gồm mẫu mô cơ và mẫu ruột từ đầm nuôi tôm sú. Sự khác biệt về sự đa dạng bên trong một hệ vi khuẩn cũng có thể quan sát được

giữa mẫu tôm khoẻ mạnh ST1 và tôm bị bệnh ST4. *Thành phần và độ đa dạng của hệ vi khuẩn trong ruột tôm thẻ chân trắng*

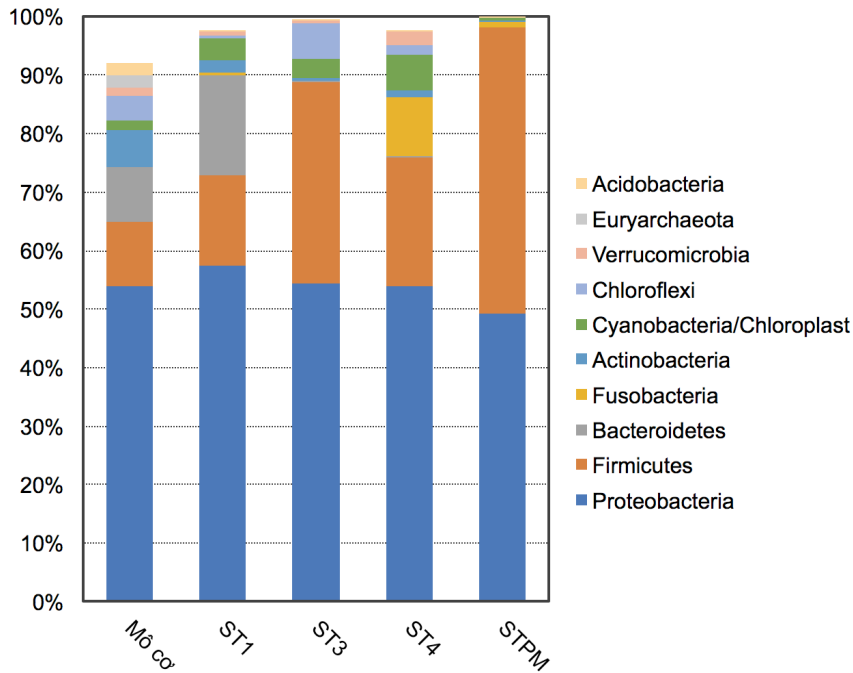
Số lượng trình tự của 10 ngành chiếm ưu thế nhất chiếm hơn 90% tổng số trình tự của toàn bộ các ngành có trong các mẫu (Hình 2). Kết quả phân tích từ hình 2 chỉ ra rằng Proteobacteria là ngành chiếm ưu thế cao nhất ở tất cả các mẫu và có tỉ lệ phần trăm

nằm trong khoảng từ 49,3 tới 57,4%. Ngành chiếm ưu thế thứ hai tính trên tất cả các mẫu là ngành Firmicutes với tỉ lệ phần trăm nằm trong khoảng từ 15,6% tới 34,4%. Sự phân bố về thành phần của hai ngành chiếm ưu thế nhất trong các mẫu ruột tôm thẻ chân trắng tương tự với sự phân bố về thành phần các vi khuẩn trong mẫu mô cơ và mẫu ruột từ đằm tôm sú. Ở ngành chiếm ưu thế tiếp theo có sự khác biệt rõ rệt giữa ba mẫu ruột tôm thẻ chân trắng. Cụ

thể, ở mẫu ruột tôm khoẻ mạnh (ST1) là ngành Bacteroidetes (16,9%), trong khi đó ở mẫu ruột tôm sinh trưởng kém (ST3) là Chloroflexi (6,15%), và ở mẫu ruột tôm bệnh (ST4) là Fusobacteria (10,02%). Thứ tự sắp xếp ba ngành chiếm ưu thế cao nhất ở mẫu ST1 có sự thay đổi vị trí giữa vị trí chiếm ưu thế số 2 và số 3 so với các mẫu còn lại trong nghiên cứu. Cụ thể ngành chiếm ưu thế thứ 2 và 3 ở mẫu ST1 lần lượt là Bacteroidetes (16,9%) và Firmicutes (15,6%).



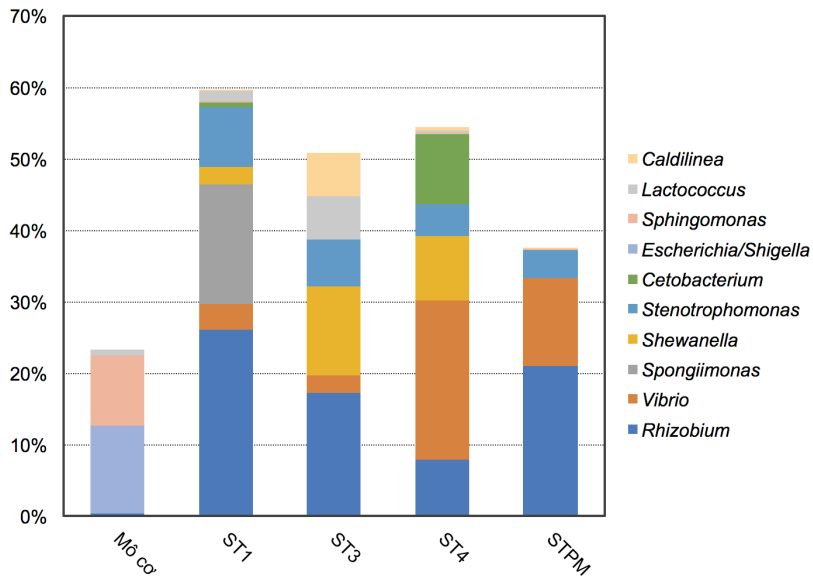
**Hình 1.** Phân tích thành phần chính (Principal component analysis - PCA). A: dựa trên weighted UniFrac distances; B: dựa trên unweighted UniFrac distances.



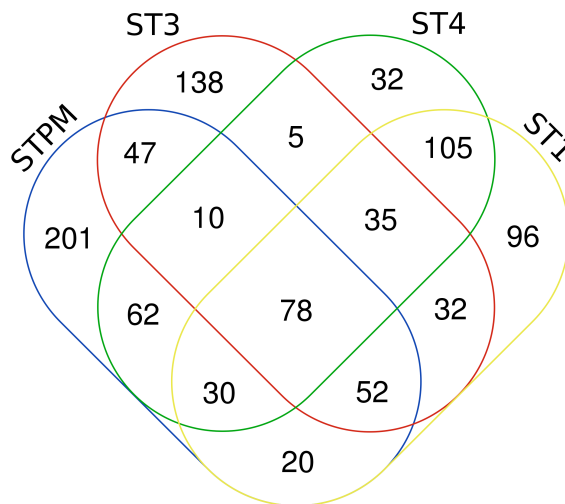
**Hình 2.** Mười ngành chiếm ưu thế nhất trong các mẫu nghiên cứu. Mô cơ; ST1: Mẫu ruột tôm khoẻ mạnh; ST3: Mẫu ruột tôm sinh trưởng kém; ST4: Mẫu ruột tôm bệnh; STPM: Mẫu ruột tôm sú khoẻ mạnh.

Số lượng trình tự của 10 chi chiếm ưu thế nhất chiếm hơn 50% tổng số trình tự của toàn bộ các chi có trong các mẫu ruột tôm thẻ chân trắng (Hình 3). Kết quả phân tích từ hình 3 chỉ ra rằng thứ tự sắp xếp của các chi chiếm ưu thế trong các mẫu có sự khác biệt rõ rệt, không những giữa các mẫu ruột tôm thẻ chân trắng với mẫu mô cơ và mẫu ruột tôm sú mà còn ở giữa các mẫu ruột tôm thẻ chân trắng với nhau. Cụ thể, ở mẫu ruột tôm khỏe mạnh ST1, *Rhizobium* là chi chiếm ưu thế cao nhất (26,1 %) tiếp

đó là chi *Spongiimonas* (16,7%), tiếp theo là chi *Stenotrophomonas* (8,4%). Ở mẫu ST3, *Rhizobium* là chi chiếm ưu thế cao nhất (17,3%), tiếp đó là chi *Shewanella* (12,5%), tiếp theo là chi *Stenotrophomonas* (6,4%). Ở mẫu ruột tôm bệnh ST4, *Vibrio* là chi chiếm ưu thế cao nhất (22,3%), tiếp đó là chi *Cetobacterium* (9,9%), tiếp theo là chi *Shewanella* (9%). Kết quả phân tích đã chỉ ra sự đa dạng giữa các mẫu ở mức độ loài (số liệu chi tiết không trình bày ở đây).



**Hình 3.** Mười chi chiếm ưu thế nhất trong các mẫu nghiên cứu. Mô cơ; ST1: Mẫu ruột tôm khỏe mạnh; ST3: Mẫu ruột tôm sinh trưởng kém; ST4: Mẫu ruột tôm bệnh; STPM: Mẫu ruột tôm sú khỏe mạnh.



**Hình 4.** Biểu đồ Venn mô tả sự chia sẻ các OTU chung giữa các mẫu nghiên cứu. ST1 (Màu vàng): Mẫu ruột tôm khỏe mạnh; ST3 (Màu đỏ): Mẫu ruột tôm sinh trưởng kém; ST4 (Màu xanh lá cây): Mẫu ruột tôm bệnh; STPM (Màu xanh dương): Mẫu ruột tôm sú khỏe mạnh. (Các con số nằm trong không gian chung giữa các mẫu thể hiện số lượng các OTU chung được chia sẻ giữa các mẫu phân tích).

### Sự chia sẻ các OTU chung giữa các mẫu nghiên cứu

Kết quả về sự chia sẻ các OTU giữa các mẫu ruột (Hình 4) cho thấy sự đa dạng giữa các mẫu nghiên cứu. Trên tổng số 1716 OTU thu được từ 4 mẫu ruột nghiên cứu, chúng tôi đã tìm thấy 943 OTU riêng biệt và 78 OTU chung được chia sẻ giữa 4 mẫu ruột nghiên cứu. Các OTU chung chia sẻ giữa các mẫu cho thấy sự gắn gũi về thành phần các vi khuẩn có trong các mẫu. Từ kết quả phân tích đã chỉ ra sự gắn gũi về thành phần các đơn vị phân loại OTU giữa các mẫu ST1 (khỏe mạnh), ST3 (sinh trưởng kém) và STPM (tôm sú) (chia sẻ 52 OTU chung), cao nhất so sánh với sự kết hợp này giữa các mẫu ST3, ST4 và STPM là 10 OTU chung; tiếp theo là ST1, ST4, STPM với 30 OTU chung; và cuối cùng là ST1, ST3, ST4 với 35 OTU chung. Kết quả này cho thấy sự khác nhau về thành phần đơn vị phân loại OTU phản ánh sự khác nhau về thành phần các vi khuẩn giữa mẫu ruột của tôm bệnh ST4 với các mẫu ruột còn lại (ST1, ST3, và STPM).

### THẢO LUẬN

Kết quả phân tích thống kê Welch's t test đã chỉ ra rằng các giá trị trong các phân tích alpha diversity là đáng tin cậy, với độ tin cậy > 95% ( $\alpha = 0.05$ ). Phân tích Beta diversity đã chỉ ra rằng độ đa dạng loài của các mẫu tôm thẻ chân trắng (ST1, ST3, ST4) phân bố thành một cụm (cluster) trong sự so sánh với độ đa dạng loài của mẫu mô cơ và mẫu ruột tôm sú (STPM). Điều này cho thấy việc sử dụng các giá trị trong các phân tích alpha diversity và beta diversity trong các phân tích tiếp theo là có ý nghĩa.

Sự khác biệt về sự phân tích mức độ đa dạng đã được chỉ ra giữa phương pháp giải trình tự thế hệ mới (NGS) so với PCR-DDGE truyền thống. Cụ thể, trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu được số lượng OTU trong khoảng từ 343 tới 514 đơn vị phân loại, số lượng các loài được dự đoán thông qua các giá trị Ace và Chao1 trong khoảng từ 513 loài cho tới 860 loài so sánh với 13 băng khuếch đại gen 16S rRNA đại diện cho sự đa dạng của toàn bộ các vi khuẩn trong một mẫu phân tích trong nghiên cứu của Zhong và đồng tác giả (Zhong *et al.*, 2015). Kết quả này cho thấy sự hiệu quả trong việc nghiên cứu các nhóm loài chiếm thành phần nhỏ trong một quần thể vi khuẩn. Kết quả này đã thể hiện một cách rõ ràng sự đa dạng về thành phần giữa các hệ vi khuẩn trong môi trường tự nhiên.

Trong nghiên cứu này thứ tự các ngành vi khuẩn chiếm đa số ở trong ruột tôm thẻ chân trắng là Proteobacteria (49,3–57,4 %), Firmicutes (15,6%–34,4%), ngoại trừ mẫu ST1, kết quả này tương đồng với nghiên cứu của Oxley *et al.* (2002) và Rungrassamee *et al.* (2014) trên hai đối tượng lần lượt là tôm bạc thẻ (*Banana prawn*) và tôm sú (*Penaeus monodon*). Ngành Proteobacteria là ngành chiếm ưu thế trong các hệ vi khuẩn được ghi nhận ở rất nhiều loài thủy sản trong đó có tôm thẻ chân trắng (Cardona *et al.*, 2016; van Kessel *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012). Sự biến động về các nhóm vi khuẩn chiếm ưu thế trong ruột đã được chứng minh có sự liên quan tới các tác nhân như chất lượng nước, chế độ ăn và mật độ nuôi (Kim, Kim, 2013; Ramírez, Romero, 2017; Wu *et al.*, 2012). Do vậy sự khác biệt ở mẫu ST1 hoàn toàn có thể tồn tại. Bên cạnh đó có thể nhận thấy rằng sự khác biệt có thể đến từ sự khác nhau giữa mẫu ruột tôm bệnh và ruột tôm khỏe mạnh. Cụ thể, ngành Fusobacterium, đã được xếp vào nhóm tác nhân gây bệnh (Afra *et al.*, 2013; Han *et al.*, 2005), đã thấy xuất hiện chủ yếu trong mẫu ruột tôm bị bệnh ST4. Sự khác biệt đáng kể theo dõi được ở mức độ ngành còn được thể hiện ở mẫu ruột tôm thẻ chân trắng khỏe mạnh là Bacteroidetes (16,9%) so với mẫu ruột tôm sinh trưởng kém (0,002%) và mẫu ruột tôm bị bệnh (0,001%). Kết quả này cho thấy sự khác biệt với kết quả của Yang *et al.* (2016), trong đó Bacteroidetes kém phong phú hơn trong các mẫu tôm bị bệnh và phong phú hơn ở các mẫu tôm khỏe mạnh. Cornejo-Granados và đồng tác giả cũng có kết quả tương tự khi so sánh thành phần vi khuẩn giữa mẫu bệnh và mẫu khỏe mạnh, kết quả của nhóm nghiên cứu cho thấy ngành Bacteroidetes xuất hiện nhiều hơn ở mẫu ruột tôm bệnh so với mẫu ruột tôm khỏe mạnh (Cornejo-Granados *et al.*, 2017). Tuy nhiên Bacteroidetes cũng đã được đánh giá là một ngành vi khuẩn quan trọng trong ruột tham gia chính vào nhiều chức năng quan trọng và phản ánh trạng thái khỏe mạnh của một số sinh vật (Gibiino *et al.*, 2018). Những nghiên cứu tiếp theo cần được tiến hành để có thể đánh giá chính xác vai trò của ngành Bacteroidetes trong ruột tôm thẻ chân trắng tại các đầm nuôi tôm bán thâm canh tại Sóc Trăng.

Ở mức độ chi, thành phần vi khuẩn trong ruột tôm thẻ chân trắng chỉ ra sự khác biệt so với nghiên cứu của Sha *et al.*, (2016). Nghiên cứu này chỉ ra rằng các chi chiếm ưu thế trong ruột tôm thẻ chân trắng là *Octadecabacter* (1,57–3,98%), *Acinetobacter* (1,1–2,81%), và *Demequina* (0,71–1,21%), trong khi trong nghiên cứu của chúng tôi các

chiếm ưu thế bao gồm *Rhizobium* (0,4–26,1%), *Vibrio* (0–22,3%), *Spongiimonas* (0–16,7%), và *Shewanella* (2,5–12,5%). Sự khác biệt là về thành phần đã được chỉ ra ở mức độ ngành với nguyên nhân là sự thay đổi của các tác nhân môi trường, chế độ ăn, tình trạng bệnh. Trong nghiên cứu của Sha *et al.* (2016), sự thay đổi các chế độ ăn đã dẫn tới sự thay đổi thành phần các nhóm vi khuẩn. Do vậy sự khác biệt về thành phần và sự sắp xếp các nhóm vi khuẩn chiếm ưu thế là hoàn toàn tồn tại. Điểm nổi bật từ kết quả nghiên cứu của chúng tôi đó là sự phong phú của chi *Vibrio* thuộc họ Vibrionaceae trong mẫu ruột tôm bệnh ST4 chiếm tới 22,3% trên tổng số các chi có trong mẫu. Họ Vibrionaceae đã được công bố là họ chiếm ưu thế trong các mẫu ruột mắc bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) (Cornejo-Granados *et al.*, 2017). Trong một số nghiên cứu khác họ Vibrionaceae thuộc ngành Gammaproteobacteria là họ chiếm ưu thế trong ruột tôm thẻ chân trắng 3 tháng tuổi, là một trong số những mầm bệnh gây hại trên tôm (Halder *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). Ở mức độ loài, điểm đặc biệt trong nghiên cứu của chúng tôi đó là sự phát hiện loài *Vibrio rotiferianus* (7,98%), đây là loài được xếp vào những mầm bệnh gây hại trên tôm thẻ chân trắng (Chowdhury *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Thành phần chi *Lactobacillus* phản ánh sự khỏe mạnh của hệ vi khuẩn đường ruột (Sha *et al.*, 2016) được tìm thấy trong mẫu ruột tôm thẻ chân trắng khỏe mạnh (114 reads) nhiều hơn so sánh với trong mẫu ruột tôm bị bệnh (2 reads) và trong mẫu ruột tôm sinh trưởng kém (2 reads). Sự xuất hiện ít của chi *Lactobacillus* có thể do khả năng bám dính của chi này với đường ruột của tôm và chúng không thể tồn tại trong ruột trong một thời gian dài (Sha *et al.*, 2016).

Các kết quả này chỉ ra rằng hệ vi khuẩn trong các mẫu tôm bị bệnh đã bị mất đi sự cân bằng giữa nhóm vi khuẩn có lợi và nhóm vi khuẩn có hại. Sự xuất hiện nhiều hơn của các nhóm vi khuẩn có khả năng gây bệnh được xem có sự liên quan tới sự mắc bệnh và gây chết trên tôm. Kết luận này phù hợp với kết quả phân tích biểu đồ Venn và phân tích mối tương quan giữa các mẫu thông qua biểu đồ PCA giữa mẫu bệnh ST4 và các mẫu còn lại. Nhận định này cần được kiểm chứng bằng việc gia tăng số lượng mẫu trong các nghiên cứu tiếp theo.

## KẾT LUẬN

Thông qua các kết quả phân tích đã làm chỉ ra thành phần và mức độ đa dạng của hệ vi khuẩn trong

ruột tôm thẻ chân trắng giữa ba đầm nuôi tôm thẻ chân trắng sau 3 tháng nuôi. Các ngành chiếm ưu thế bao gồm Proteobacteria (49,3–57,4 %), Firmicutes (15,6–34,4%), Bacteroidetes (0,1–16,9%) trên tổng số toàn bộ các ngành có trong các mẫu ruột tôm thẻ chân trắng nghiên cứu. *Rhizobium* (0,4–26,1%), *Vibrio* (0–22,3%), *Spongiimonas* (0–16,7%) là các chi chiếm ưu thế trên tổng số các chi có trong các mẫu nghiên cứu. Kết quả phân tích cũng góp phần dự đoán sự có mặt của các tác nhân có khả năng gây bệnh trên tôm ở mẫu ruột tôm bị bệnh (ST4) bao gồm: ngành Fusobacterium, chi *Vibrio*.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Nghiên cứu metagenome của vi sinh vật trong các đầm nuôi tôm, góp phần tạo cơ sở khoa học để phát triển nghề nuôi tôm ở Việt Nam”, mã số ĐTDLCN.16/14 (2017) từ Bộ Khoa học Công nghệ Việt Nam.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Afra K, Lauplan K, Leal J, Lloyd T, Gregson D (2013) Incidence, risk factors, and outcomes of Fusobacterium species bacteremia. *BMC Infect Dis* 13: 264.
- Al-Harbi AH, Uddin N (2005) Bacterial diversity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in brackish water in Saudi Arabia. *Aquaculture* 250: 566–572.
- Cardona E, Gueguen Y, Magré K, Lorgeoux B, Piquemal D, Pierrat F, Noguier F, Saulnier D (2016) Bacterial community characterization of water and intestine of the shrimp *Litopenaeus stylirostris* in a biofloc system. *BMC Microbiol* 16: 157.
- Chowdhury PR, Boucher Y, Hassan KA, Paulsen IT, Stokes HW, Labbate M (2011) Genome Sequence of *Vibrio rotiferianus* Strain DAT722<sup>γ</sup>. *J Bacteriol* 193: 3381–3382.
- Cornejo-Granados F, Lopez-Zavala AA, Gallardo-Becerra L, Mendoza-Vargas A, Sánchez F, Vichido R, Briebe LG, Viana MT, Sotelo-Mundo RR, Ochoa-Leyva A (2017) Microbiome of Pacific Whiteleg shrimp reveals differential bacterial community composition between Wild, Aquacultured and AHPND/EMS outbreak conditions. *Sci Rep* 7: 11783.
- Dhanasiri AKS, Brunvold L, Brinchmann MF, Korsnes K, Bergh Ø, Kiron V (2011) Changes in the intestinal microbiota of wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing. *Microb Ecol* 61: 20–30.
- Fraune S, Bosch TCG (2010) Why bacteria matter in animal development and evolution. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 32: 571–580.

- Gibiino G, Lopetus LR, Scaldaferri F, Rizzatti G, Binda C, Gasbarrini A (2018) Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals. *Dig Liver Dis* 50(7): 635–639
- Glenn TC (2011) Field guide to next-generation DNA sequencers. *Mol Ecol Resour* 11: 759–769.
- Haldar S, Chatterjee S, Sugimoto N, Das S, Chowdhury N, Hinenoya A, Asakura M, Yamasaki S (2011) Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an Artemia model. *Microbiol Read Engl* 157: 179–188.
- Han YW, Ikegami A, Rajanna C, Kawsar HI, Zhou Y, Li M, Sojar HT, Genco RJ, Kuramitsu HK, Deng CX (2005) Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral fusobacteria. *J Bacteriol* 187: 5330–5340.
- Huang Z, Li X, Wang L, Shao Z (2014) Changes in the intestinal bacterial community during the growth of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Res* 47: 1737–1746.
- Kim D-H, Kim D (2013) Microbial diversity in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 414-415: 103–108.
- Li X, Zhou L, Yu Y, Ni J, Xu W, Yan Q (2017) Composition of Gut Microbiota in the Gibel Carp (*Carassius auratus gibelio*) Varies with Host Development. *Microb Ecol* 74: 239–249.
- Oxley APA, Shipton W, Owens L, McKay D (2002) Bacterial flora from the gut of the wild and cultured banana prawn, *Penaeus merguensis*. *J Appl Microbiol* 93: 214–223.
- Qiao F, Liu YK, Sun YH, Wang XD, Chen K, Li TY, Li EC, Zhang ML (2017) Influence of different dietary carbohydrate sources on the growth and intestinal microbiota of *Litopenaeus vannamei* at low salinity. *Aquac Nutr* 23: 444–452.
- Qin Y, Hou J, Deng M, Liu Q, Wu C, Ji Y, He X (2016) Bacterial abundance and diversity in pond water supplied with different feeds. *Sci Rep* 6: srep35232.
- Ramírez C, Romero J (2017) Fine Flounder (*Paralichthys adspersus*) Microbiome Showed Important Differences between Wild and Reared Specimens. *Front Microbiol* 8: 271.
- Ravel J, Blaser MJ, Braun J, Brown E, Bushman FD, Chang EB, Davies J, Dewey KG, Dinan T, Dominguez-Bello M, Erdman SE, Finlay BB, Garrett WS, Huffnagle GB, Huttenhower C, Jansson J, Jeffery IB, Jobin C, Khoruts A, Kong HH, Lampe JW, Ley RE, Littman DR, Mazmanian SK, Mills DA, Neish AS, Petrof E, Relman DA, Rhodes R, Turnbaugh PJ, Young VB, Knight R, White O (2014) Human microbiome science: vision for the future, Bethesda, MD, July 24 to 26, 2013. *Microbiome* 2: 16.
- Rungrassamee W, Klanchui A, Maibunkaew S, Chaiyapechara S, Jiravanichpaisal P, Karoonuthaisiri N (2014) Characterization of Intestinal Bacteria in Wild and Domesticated Adult Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). *PLOS ONE* 9: e91853.
- Sha Y, Liu M, Wang B, Jiang K, Qi C, Wang L (2016) Bacterial Population in Intestines of *Litopenaeus vannamei* Fed Different Probiotics or Probiotic Supernatant. *J Microbiol Biotechnol* 26: 1736–1745.
- Sun Z, Li G, Wang C, Jing Y, Zhu Y, Zhang S, Liu Y (2014) Community dynamics of prokaryotic and eukaryotic microbes in an estuary reservoir. *Sci Rep* 4: 6966.
- Suo Y, Li E, Li T, Jia Y, Qin JG, Gu Z, Chen L (2017) Response of gut health and microbiota to sulfide exposure in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish Shellfish Immunol* 63: 87–96.
- Tổng cục thủy sản (2017) Chủ động phòng trị dịch bệnh trên tôm nuôi.
- Tzuc JT, Escalante DR, Rojas Herrera R, Gaxiola Cortés G, Ortiz MLA (2014) Microbiota from *Litopenaeus vannamei*: digestive tract microbial community of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *SpringerPlus* 3: 280.
- van Kessel MA, Dutilh BE, Neveling K, Kwint MP, Veltman JA, Flik G, Jetten MS, Klaren PH, Op den Camp HJ (2011) Pyrosequencing of 16S rRNA gene amplicons to study the microbiota in the gastrointestinal tract of carp (*Cyprinus carpio L.*). *AMB Express* 1: 41.
- VASEP (2018) Xuất khẩu tôm chân trắng có thể tăng hơn nữa trong 2018. *Hiệp hội chế biến và xuất khẩu Thủy sản Việt Nam*.
- Wang L, Chen Y, Huang H, Huang Z, Chen H, Shao Z (2014) Isolation and identification of *Vibrio campbellii* as a bacterial pathogen for luminous vibriosis of *Litopenaeus vannamei*. *Aquac Res* 46: 395–404.
- Wu S, Gao T, Zheng Y, Wang W, Cheng Y, Wang G (2010) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Aquaculture* 303: 1–7.
- Wu S, Wang G, Angert ER, Wang W, Li W, Zou H (2012) Composition, Diversity, and Origin of the Bacterial Community in Grass Carp Intestine. *PLOS ONE* 7: e30440.
- Yang K, Wang X, Xiong J, Qiu Q, Huang L, Zhang H, Guo A, Li L, Zhang D (2016) Comparison of the bacterial community structures between healthy and diseased juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*) digestive tract. *J Fisheries China* 40: 1765–1773.
- Zhang M, Sun Y, Chen K, Yu N, Zhou Z, Chen L, Du Z, Li E (2014) Characterization of the intestinal microbiota in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, fed diets with different lipid sources. *Aquaculture* 434: 449–455.



Zhang X-J, Yan B-L, Bai X-S, Bi K-R, Gao H, Qin G-M (2014) Isolation and Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio rotiferianus* Associated with Mass Mortality of Chinese Shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *J Shellfish Res* 33: 61–68.

Zhang Y, Ruan X, Wan Y, Li X (2016) Effects of Environmental Factors on Anammox Bacterial Community Structure in Sediments of a Freshwater

Aquaculture Farm, Yangcheng Lake. *Geomicrobiol J* 33: 479–487.

Zhong F, Wu J, Dai Y, Yang L, Zhang Z, Cheng S, Zhang Q (2015) Bacterial community analysis by PCR-DGGE and 454-pyrosequencing of horizontal subsurface flow constructed wetlands with front aeration. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 1499–1512.

## COMPARISON OF BACTERIAL COMMUNITY STRUCTURES IN DIGESTIVE TRACT BETWEEN HEALTHY AND DISEASE WHITELEG SHRIMP (*LITOPENAEUS VANNAMEI*) IN SOC TRANG, VIETNAM

Tran Trung Thanh<sup>1,2,3</sup>, Nathan Bott<sup>2</sup>, Le Hoang Duc<sup>1,3</sup>, Dang Thi Hoang Oanh<sup>4</sup>, Nguyen Trung Nam<sup>1,3</sup>, Chu Hoang Ha<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>2</sup>*RMIT University, Australia*

<sup>3</sup>*Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

<sup>4</sup>*Can Tho University*

### SUMMARY

Gut bacteria comprise a complex bacterial community related to many functions in a host. The stability of gut bacteria plays important models in the health and immunology of a host. Many studies on intestine bacteria constructed via cultivation and Denaturation Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) methods have proved a limited efficiency. In order to tackle these drawbacks, the next generation sequencing method was developed on 16S-rRNA-based sequences (Metabarcoding). The composition of bacterial communities was revealed based on the analysis of 16S rRNA sequences of intestine bacteria in *Litopenaeus vannamei* ponds in comparison with microbial communities in a *Penaeus monodon* pond and a muscle of shrimp. These results showed that the dominant phyla of intestine bacteria in *Litopenaeus vannamei* were Proteobacteria (49.3–57.4%), Firmicutes (15.6–34.4%) and Bacteroidetes (0.1–16.9%). *Rhizobium* (0.4%–26.1%), *Vibrio* (0–23.9%) and *Sphingomonas* (0–16.7%) were dominant genera in *Litopenaeus vannamei* gut. A higher proportion of *Fusobacterium* (10%), a shrimp pathogen group, was found in a disease shrimp pond (ST4) in comparison with a low growth shrimp pond (ST3) (0%) and a healthy shrimp pond (ST1) (0.6%). *Vibrio* was marked as shrimp pathogen genus accounted for 22.3% of total genera in ST4 in comparison with 2.4% in ST3 and 3.5% in ST1. Interestingly, a higher percentage of *Vibrio rotiferianus* (7.98%) was found in ST4 compared to ST3 (1%) and ST1 (0%). *Fusobacterium* and *Vibrio* will be the objects for the next experiments to discover shrimp pathogens specifically.

**Keywords:** *Litopenaeus vannamei*, metabarcoding, *Fusobacterium*, bacterial composition in digestive tract, *Vibrio*