

THÀNH PHẦN VI SINH VẬT PHÂN LẬP TỪ VẾT LOÉT “BÃ ĐẬU” Ở BA BA DA TRON (*Pelodiscus sinensis*) NUÔI TẠI NAM ĐỊNH VÀ ĐẶC TÍNH ĐỘC LỰC CỦA CÁC CHỦNG *Aeromonas* spp.

Hoàng Thị Lan Anh¹, Bùi Nguyễn Hải Linh¹, Nguyễn Hữu Tuấn Dũng¹, Lê Thị Thanh Huệ¹, Nguyễn Việt Hà¹, Lương Minh Cường², Trịnh Thành Trung^{1,✉}

¹Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc gia Hà Nội

²Công ty TNHH Đầu tư Phát triển Nông nghiệp Hưng Bản

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: tttrung@vnu.edu.vn

Ngày nhận bài: 16.11.2020

Ngày nhận đăng: 26.5.2021

TÓM TẮT

Ba ba da trơn (*Pelodiscus sinensis*) là một loại đặc sản nước ngọt hiện đang được nuôi khá phổ biến ở nước ta. Dịch bệnh trên ba ba nuôi xảy ra thường xuyên gây thiệt hại nặng nề về kinh tế cho người nuôi. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành phân lập các vi sinh vật từ mẫu vết loét “bã đậu” trên ba ba nuôi tại Nam Định. Các mẫu được cấy trên các môi trường thông dụng cho nuôi cấy vi khuẩn, xạ khuẩn, nấm sợi và nấm men. Chỉ có vi khuẩn mọc đặc trưng trên môi trường nuôi cấy. Mười lăm chủng vi khuẩn đã được phân lập và định danh bằng kỹ thuật giải trình tự 16S rDNA. Các chủng vi khuẩn được xác định thuộc các chi *Acidovorax* (n=1), *Acinetobacter* (n=1), *Aeromonas* (n=8), *Citrobacter* (n=1), *Chryseobacterium* (n=1), *Moraxella* (n=1), *Paludibacterium* (n=1) và *Parabacteroides* (n=1). Tám chủng *Aeromonas* spp. được lựa chọn nghiên cứu sâu hơn về đặc tính độc lực. Kết quả PCR cho thấy, các chủng này đều có ít nhất 4/7 gen độc tố gồm *aer* (75%), *alt* (37,5%), *ast* (50%), *ela* (87,5%), *exu* (100%), *hlyA* (37,5%) và *ser* (100%). Các chủng *Aeromonas* spp. biểu hiện độc tính sinh haemolysin (100%), protease (75%), DNAase (75%), elastase (25%) và gây độc tế bào (62,5%). Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học định hướng xây dựng các phương pháp kiểm soát và phòng ngừa bệnh “bã đậu” trên ba ba trong thời gian tới.

Từ khóa: *Aeromonas*, ba ba da trơn (*Pelodiscus sinensis*), bệnh viêm loét, gen độc tố

MỞ ĐẦU

Aeromonas là chi vi khuẩn Gram âm, hình que, kỵ khí không bắt buộc, phản ứng catalase và oxidase dương tính. Hiện chi này có 36 loài, phân bố rộng rãi ở nước ngọt và lợ như sông, hồ, ao, nước ngầm hoặc cả trong nước được khử trùng bằng clo (Chen *et al.*, 2015; Khor *et al.*, 2015; Fernandez-Bravo, Figueras, 2020). Một số loài thuộc chi *Aeromonas* được biết đến là nguyên nhân gây bệnh cho các động vật thủy sản (cá, tôm, hào...) như nhiễm trùng huyết, hội chứng loét, viêm ruột xuất huyết, bệnh đỏ thân và sung (Abdelhamed *et al.*, 2017; Mzula *et al.*, 2019). Ở người, aeromonads đã được báo cáo là nguyên nhân đối với cả nhiễm trùng đường tiêu hóa và ngoài đường tiêu hóa, đặc biệt ở những bệnh nhân suy giảm miễn dịch. Con người có thể bị nhiễm aeromonads từ thức ăn, nước và các hoạt động giải trí (chèo thuyền, trượt tuyết, câu cá và lặn) (Khor *et al.*, 2015).

Có ít nhất 19 loài trong chi *Aeromonas* được báo cáo có khả năng gây bệnh trên người trong đó chiếm tới 95,4% là các loài *A. caviae* (37,26%), *A. dhakensis* (23,49%), *A. veronii* (21,54%) và *A. hydrophila* (13,07%) (Fernandez-Bravo, Figueras, 2020). Việc sản sinh các yếu tố độc lực là điều cần thiết để vi khuẩn xâm nhiễm vào vật chủ và gây nhiễm trùng. Ở *Aeromonas*, đã có rất nhiều gen mã hóa cho các yếu tố độc lực đã được mô tả (Khor *et al.*, 2015). Quá trình gây bệnh của *Aeromonas* là rất phức tạp và việc phát hiện các yếu tố độc lực là cần thiết để xác định khả năng gây bệnh tiềm ẩn đối với mỗi loài.

Ba ba da trơn (*Pelodiscus sinensis*) là một trong những đối tượng nuôi thương mại quan trọng nhất trong số các loài thủy sản được nuôi trồng ở các nước Châu Á như Trung Quốc, Nhật Bản, Đài Loan, Hàn Quốc... với giá trị cao về mặt dinh dưỡng và y học (Li *et al.*, 2012; Ip *et al.*, 2013). Ở Việt Nam, đây là loài ba ba được nuôi rộng rãi ở các tỉnh thành trong cả

nước và được coi là đối tượng đặc sản nước ngọt có giá trị kinh tế cao. Từ năm 1993, việc nuôi ba ba tại các trang trại gia đình ở tỉnh Hải Dương đã được ghi nhận và cho đến nay đã mở rộng ra các tỉnh thành trong cả nước (http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Trionyx_sinensis/en).

Trong những năm gần đây, cùng với việc mở rộng liên tục quy mô nuôi trồng thủy sản, các bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn cũng đang gia tăng và gây thiệt hại nghiêm trọng về mặt kinh tế cho ngành nuôi trồng thủy sản nói chung và ngành nuôi ba ba nói riêng (Xiao *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013). Các bệnh truyền nhiễm gây ra loét da, hoại tử mai và nhiễm trùng huyết ở ba ba thường do các tác nhân quan trọng như *Aeromonas* spp., *Citrobacter freundii*, *Edwardsiella tarda* hoặc ít gặp hơn là *Chryseobacterium* spp. và *Morganella morganii* (Xiao *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2013; Chung *et al.*, 2017). Do đó, việc phát hiện những mầm bệnh này là ưu tiên hàng đầu cho việc quản lý dịch bệnh thủy sản.

Ở Việt Nam, tại các trang trại nuôi, ba ba bị bệnh “bã đậu” thường có các triệu chứng bên ngoài như có các vết loét xuất huyết hoặc đóng kén trắng trên đầu, cổ, chân hoặc phần mềm của mai. Khi ba ba bị bệnh

sẽ kém ăn, gầy yếu, mắt xuất huyết đỏ, móng chân rụng và bị chết khi bệnh trở nặng, gây thiệt hại rất lớn về kinh tế cho người nuôi.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã xác định các vi sinh vật chủ yếu có trong vết loét “bã đậu” của ba ba da trơn, trong đó chủ yếu tập trung vào nhóm vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* với sự có mặt của các gen mã hóa cho các yếu tố gây độc và việc biểu hiện một số kiểu hình của chúng. Đây là kết quả nghiên cứu khoa học đầu tiên được công bố trên ba ba bị bệnh “bã đậu” tại Việt Nam. Kết quả sẽ là cơ sở để đưa ra các giải pháp hiệu quả trong điều trị bệnh nhiễm trùng do vi khuẩn cũng như cung cấp các thông tin cần thiết cho công tác quản lý dịch bệnh tại các trang trại nuôi ba ba ở các địa phương.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Năm mẫu ba ba giống nuôi trong bể composite (khoảng 10 g/con) và ba ba giai đoạn thả ao (500- 700 g/con) được thu tại trang trại nuôi tại huyện Vụ Bản, Nam Định vào tháng 7/2020 với các triệu chứng của bệnh “bã đậu” (Hình 1).



A



B

Hình 1. Ảnh chụp ba ba giai đoạn giống (A) và giai đoạn thả ao (B) có triệu chứng bị bệnh “bã đậu”.

Phân lập vi sinh vật trong vết loét “bã đậu”

Trước khi phân lập các vi sinh vật, phía xung quanh các vết thương của ba ba bệnh được làm sạch bằng cồn 70° và được rửa bằng nước cất vô trùng. Tại địa điểm thu mẫu, mẫu từ các vết loét trên mai hoặc chân ba ba được lấy bằng tăm bông vô trùng và cấy lên các môi trường thạch như môi trường Columbia có bổ sung 5% máu cừu, Muller-Hinton (MH), de Man, Rogosa and Sharpe (MRS), Yeast and Malt extract (YM) và Yeast Starch (YS). Sau đó, các đĩa nuôi cấy được đưa về phòng thí nghiệm và ủ trong tủ ấm ở 30°C trong 24-36 h. Quan sát, lựa chọn các khuẩn lạc riêng rẽ và cấy chuyển trên môi

trường thích hợp để thu các chủng thuần khiết.

Định danh và xác định một số đặc điểm sinh lý, sinh hóa của các chủng vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn phân lập thuần được định danh dựa trên việc giải trình tự gen 16S rRNA. DNA tổng số của chủng vi khuẩn được tách chiết theo mô tả của Smith *et al.*, (1995). Gen 16S rRNA của các chủng vi khuẩn này được khuếch đại bằng PCR sử dụng DNA tổng số làm khuôn với cặp mồi 8F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' và 1492R: 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'. Sản phẩm PCR sau đó được tinh sạch và giải trình tự tại công ty First BASE Laboratories

(Malaysia). Mức độ tương đồng cao nhất về trình tự đoạn gen 16S rRNA của các chủng nghiên cứu thu được so với các chủng chuẩn đã công bố được tra cứu sử dụng công cụ 16S-based ID (<https://www.ezbiocloud.net/>) cập nhật đến ngày 30/10/2020.

Các đặc điểm sinh hóa được xác định dựa trên kit API 20E theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Khuẩn lạc đã được hoạt hóa trên môi trường thạch MH sau 18-24 h được đưa bằng que tăm bông vào ống nghiệm có chứa NaCl 0,85% để đạt mật độ 0,09-0,11 McFarland. Phần huyền phù vi khuẩn này được đưa vào các ống phản ứng trên thanh API 20E (Biomerieux, Pháp). Thanh API được ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 30°C. Sau 24 h nuôi cấy, kết quả âm tính và dương tính đối với mỗi phản ứng sinh hóa được đọc theo chỉ dẫn của nhà sản xuất.

Xác định một số kiểu hình của các yếu tố độc lực

Hoạt tính làm tan máu của các chủng vi khuẩn được tiến hành theo mô tả của Mzula *et al.*, (2020). Các chủng vi khuẩn được cấy lên đĩa thạch Columbia có bổ sung 5% máu cừu và nuôi ở 30°C trong 48 h. Chủng được xem là có hoạt tính làm tan máu nếu xung quanh khuẩn lạc xuất hiện màu vàng sáng.

Hoạt tính sinh protease được kiểm tra trên môi trường thạch có bổ sung 10% (w/v) skim milk. Khuẩn lạc được cấy vạch trên đĩa thạch và nuôi ở 30°C trong 48 h. Sự hiện diện của một vùng trong suốt xung quanh các khuẩn lạc cho thấy chủng vi khuẩn có hoạt tính protease (Benson, 2002).

Hoạt tính DNase theo phương pháp DTT (DNase Tube Test) của Gerceker *et al.*, (2009) với một số thay đổi phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm: 0,4 µg DNA của vi khuẩn *E. coli* và vi khuẩn thử nghiệm (lấy một vòng nhỏ que cấy) được bổ sung vào 200 µL môi trường Brain Heart Infusion (BHI) lỏng đựng trong ống eppendorf 1,5 mL và lắc ở 37°C, 115 rpm. Sau 1 h ủ, 30 µL of dịch trong ống được lấy ra và ly tâm ở 10.000 rpm/min trong 10 min. Dịch trên được chạy điện di trên gel agarose 0,9% có chứa red safe và quan sát dưới UV transilluminator. DNA trong 200 µL môi trường lỏng BHI không bổ sung vi khuẩn thử nghiệm được sử dụng làm đối chứng âm.

Hoạt tính elastase xác định theo mô tả Sreedharan *et al.*, (2011). Vi khuẩn được cấy trên môi trường thạch Luria-Bertani (LB) có bổ sung 0,2% elastin (Sigma-Aldrich). Sự hiện diện của một vùng trong suốt xung quanh các khuẩn lạc cho thấy chủng vi khuẩn có hoạt tính elastase.

Hoạt tính gây độc tế bào được tiến hành theo mô tả của Ghatak *et al* (2006) sử dụng đồng tế bào phôi

thân người HEK 3T3 (Phòng thí nghiệm trọng điểm Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội). Các tế bào được nuôi cấy bằng môi trường Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Corning) bổ sung 10% (v/v) huyết tương bào thai bò (FBS, Gibco) và 1% penicillin/streptomycin (Gibco) ở 37°C trong 24 h, 5% CO₂. Dịch nuôi vi khuẩn *Aeromonas* spp. trong môi trường lỏng BHI ở 30°C sau 16 h được lọc qua filter 0,2 µm. Các tế bào nuôi trên đĩa 96 giếng với mật độ 10⁴ tế bào/giếng được ủ với 100 µL dịch nuôi chủng vi khuẩn cần nghiên cứu và *Bacillus clausii* (đối chứng âm) được pha loãng 2, 4 và 8 lần bằng môi trường BHI. Đĩa nuôi cấy được ủ ở 37°C, 5% CO₂ và theo dõi sự thay đổi của tế bào sau khi ủ ở với dịch nuôi vi khuẩn sau 24 h. Sau đó, tế bào được cố định bằng formaldehyde 4% và nhuộm bằng tím tinh thể. Hình dạng tế bào được quan sát dưới kính hiển vi điện tử Axio Imager. A2 (Carl Zeiss, Đức).

Phát hiện các gen mã hóa cho các yếu tố gây độc ở vi khuẩn *Aeromonas*

Sự có mặt của 7 gen mã hóa cho các yếu tố gây độc ở *Aeromonas* bao gồm các gen *aer* (aerolysin), *alt* (heat-labile cytotoxic enterotoxin), *ast* (heat-stable cytotoxic enterotoxin), *ela* (elastase), *exu* (DNase), *hlyA* (hemolysin) và *ser* (serine protease) được xác định bằng phương pháp PCR sử dụng các cặp mồi đặc hiệu chỉ ra trên Bảng 1.

Phản ứng PCR được thực hiện với 25 µL hỗn hợp phản ứng chứa 1 µL DNA khuôn (nồng độ 200 ng/µL), 12,5 µL Master Mix và 1 µL mồi mỗi loại, 9,5 µL H₂O. Chu trình nhiệt: 94°C-2 min, (94°C-30 s, 51-66°C-30 s, 72°C-30 s), lặp lại 35 chu kỳ; 72°C-10 min. Nhiệt độ gắn mồi của từng gen cụ thể như sau: *aer*-55,5°C, *alt*-53°C, *ast*-52°C, *ela*-6,5°C, *exu*-51°C, *hlyA*-66°C và *ser*-56°C. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1,5%.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Phân lập và định danh các vi sinh vật hiện diện trong vết loét “bã đậu”

Với các môi trường thông dụng được sử dụng để phân lập các nhóm vi sinh vật, chúng tôi thấy rằng các chỉ cơ nhóm vi khuẩn mọc đặc trưng trên môi trường nuôi cấy. Mười lăm chủng vi khuẩn đã được phân lập và định danh bằng phương pháp giải trình tự gen 16S rRNA. Các chủng này thuộc về 10 loài là *Acidovorax wautersii*, *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas jandaei*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. veronii*, *Citrobacter pasteurii*, *Chryseobacterium rhizoplanae*, *Moraxella osloensis*, *Paludibacterium purpuratum* và *Parabacteroides chartae* (Bảng 2).

Bảng 1. Trình tự các mồi nhân gen mã hóa cho các yếu tố gây độc ở *Aeromonas* (Khor *et al.*, 2015).

Gen	Sản phẩm protein	Trình tự (5'-3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
<i>aer</i>	Aerolysin/hemolysin	CCGTTTCATCACACCGTTGTAGTCG/CCAGTTCCA GTCCCACCACT	431
<i>alt</i>	Heat-labile cytotoxic enterotoxin	AAAGCGTCTGACAGCGAAGT/AGCGCATAGGCGT TCTCTT	320
<i>ast</i>	Heat-stable cytotoxic enterotoxin	ATCGTCAGCGACAGCTTCTT/CTCATCCCTTGGC TTGTTGT	504
<i>ela</i>	Elastase	ACACGGTCAAGGAGATCAAC/CGCTGGTGTGGC CAGCAGG	513
<i>exu</i>	DNase	RGACATGCACAACCTCTTCC/GCTTGGTATTGCC YTGCAAS	323
<i>hlyA</i>	Hemolysin	ATGAGTTTTGCCGATAGTTTATTTTCTGA/TTAC GATTCCTGAGCGGGCTTGTCCGGCCGGCGTG	1320
<i>ser</i>	Serine protease	ACGGAGTGCCTTCTTCTACTCCAG/CCGTTTCAT CACACCGTTGTAGTCG	211

Ghi chú: R: A/G; Y: C/T; S: G/C

Bảng 2. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn đã phân lập bằng kỹ thuật giải trình tự gen 16S rRNA.

Kí hiệu mẫu	Tên loài	Độ tương đồng (%)	Mã số trình tự tham chiếu/Chủng chuẩn	Mã VTCC
BaB 1.1	<i>Aeromonas jandaei</i>	100	CDBV01000055/ CECT 228(T)	VTCC 70161
BaB 1.2	<i>Parabacteroides chartae</i>	99,30	JN029805/NS31-3(T)	VTCC 70169
BaB 1.3	<i>Paludibacterium purpuratum</i>	97,99	JN624304 / KJ031(T)	VTCC 70170
BaB 2.1	<i>Aeromonas jandaei</i>	99,86	CDBV01000055/ CECT 228(T)	VTCC 70162
BaB 2.2	<i>Acidovorax wautersii</i>	96,98	jgi.1068022/ DSM 27981(T)	VTCC 70171
BaB 2.3	<i>Moraxella osloensis</i>	98,60	CP014234/ CCUG 350(T)	VTCC 70172
BaB 3.1	<i>Aeromonas jandaei</i>	99,79	CDBV01000055/ CECT 228(T)	VTCC 70163
BaB 3.2	<i>Aeromonas jandaei</i>	99,79	CDBV01000055/ CECT 228(T)	VTCC 70164
BaB 4.1	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	100	CP000462/ ATCC 7966(T)	VTCC 70165
BaB 4.2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	100	ACQB01000091/ ATCC 19606(T)	VTCC 70173
BaB 5.1	<i>Aeromonas veronii</i>	99,86	CDDK01000015/ CECT 4257(T)	VTCC 70166
BaB 5.2	<i>Chryseobacterium rhizoplanae</i>	99,41	KP033261/ JM-534(T)	VTCC 70174
BaB 5.3	<i>Citrobacter pasteurii</i>	99,31	CDHL01000036/ CIP 55.13(T)	VTCC 70175
BaB 5.4	<i>Aeromonas hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	100	CP000462/ ATCC 7966(T)	VTCC 70167
BaB 5.5	<i>Aeromonas veronii</i>	99,79	CDDK01000015/ CECT 4257(T)	VTCC 70168

BaB 1.1-BaB 3.2: các chủng vi khuẩn phân lập từ 3 cá thể ba ba giai đoạn thả ao; BaB 4.1- BaB 5.5: các chủng vi khuẩn phân lập từ 2 cá thể ba ba giống.

Trong số 15 chủng đã định danh, một số loài thuộc các chi như *Aeromonas*, *Citrobacter* và *Chryseobacterium* đã được công bố là nguyên nhân gây bệnh trên ba ba. Ví dụ, loài *Citrobacter freundii* đã được biết đến là tác nhân gây bệnh loét da, nhiễm trùng huyết kèm theo hoại tử gan hay *Chryseobacterium indologenes* gây hoại tử mai. Đáng chú ý hơn cả là ba loài *Aeromonas jandaei*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*, *A. veronii*. Đây là những loài thường xuyên được phân lập từ ba ba bị bệnh với các triệu chứng lâm sàng khác nhau như viêm loét, nhiễm trùng huyết, mai mềm... (Chen *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015; Chung *et al.*, 2017). Các trường hợp khác như *Acidovorax wautersii*, *Acinetobacter baumannii*, *Moraxella osloensis*, *Parabacteroides charta* và *Paludibacterium purpuratum* theo hiểu biết của chúng tôi thì chưa có báo cáo nào về việc xâm nhiễm và gây bệnh của chúng trên ba ba.

Do tính phổ biến của các chủng *Aeromonas* spp. trong mẫu ba ba bị bệnh, chúng tôi tập trung nghiên cứu trên 8 chủng vi khuẩn thuộc chi này. Trên môi trường thạch MH, khuẩn lạc của chúng vi

khuẩn thuộc chi *Aeromonas* có màu vàng nhạt, tròn đều, lồi, có đường kính từ 0,5-2 mm sau 24 h nuôi ở 30°C. Các chủng vi khuẩn có khả năng phát triển và gây tan huyết trên môi trường thạch Columbia có chứa 5% máu cừu.

Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của các chủng *Aeromonas*

Quan sát dưới vật kính 100X, vi khuẩn bắt màu Gram âm, có dạng que ngắn, hai đầu tròn, có khả năng di động, phản ứng dương tính với oxidase. Tám chủng *Aeromonas* spp. được lưu giữ tại Trung tâm Nguồn gen Vi sinh vật Quốc gia (VTCC) của Viện Vi sinh vật và Công nghệ sinh học, Đại học Quốc Gia Hà Nội với mã số đăng kí từ VTCC 70161- VTCC 70178. Kết quả xác định bằng kit API 20E cho thấy 8 chủng vi khuẩn phân lập cho phản ứng dương tính với lysine decarboxylase, genatinase, oxidase; có khả năng sinh indol, khử nitrate thành nitrite; đều sử dụng đường glucose và D-mannitol. Tuy nhiên, cả 8 chủng này đều âm tính với urease, tryptophane deaminase; không có khả năng sử dụng inositol, D-sorbitol, L-rhamnose và amygdadin (Bảng 3).

Bảng 3. Đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa của 8 chủng vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* phân lập từ vết loét “bã đậu” ở ba ba.

Chỉ tiêu	Kí hiệu chủng							
	VTCC 70161	VTCC 70162	VTCC 70163	VTCC 70164	VTCC 70165	VTCC 70166	VTCC 70167	VTCC 70168
Nhuộm Gram	-	-	-	-	-	-	-	-
Hình dạng	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+	+
Di động	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	-	-	-	+	+	+	+	+
ADH	+	+	-	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	-	-	-	+	-	-	-	-
CIT	+	-	-	+	-	+	-	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	-	+	+	+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	-	-	-	-	-	-	-	-
SAC	+	+	-	-	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	-	-	-	-
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	-	-	-	-	+	-	+	-
NO ₃ ⁻ → NO ₂ ⁻	+	+	+	+	+	+	+	+

ONPG: Ortho-nitrophenyl galactosidase; ADH: arginine dihydrolase; LDC: lysine decarboxylase; ODC: ornithine decarboxylase; CIT: sử dụng citrate; H₂S: sinh H₂S; URE: urease; TDA: tryptophane deaminase; IND: sinh indole; VP: phản ứng Voges-Proskauer; GEL: gelatinase; GLU: glucose; MAN: mannitol; INO: inositol; SOR: sorbitol; RHA: rhamnose; SAC: sucrose; MEL: melibiose; AMY: amygdaline; ARA: arabinose.

Đặc điểm kiểu hình của các yếu tố gây độc

Các phương pháp khác nhau đã được sử dụng để kiểm tra việc biểu hiện kiểu hình của một số gen mã hóa cho các yếu tố gây độc như làm tan máu, phân hủy DNA, thủy phân protein và gây độc tế bào (Bảng 4).

Kết quả cho thấy, khả năng làm tan máu và sinh protease được quan sát ở 8/8 và 6/8 chủng nghiên cứu, tương ứng chiếm 100% và 75%, trong đó mạnh nhất là hai chủng VTCC 70165, VTCC 70167 thuộc loài *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*. 6/8 chủng nghiên cứu (chiếm 75%) cũng cho thấy khả năng thủy phân DNA và 4 chủng thuộc loài *A. jandaei* cho thấy hoạt tính DNAase mạnh nhất, sau đó là chủng thuộc loài *A.*

veroni và cuối cùng là *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*. Chỉ có 2 chủng thuộc loài *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* biểu hiện hoạt tính elastase và 5/8 chủng thuộc 2 loài *A. jandaei* và *A. veroni* thể hiện khả năng gây độc trên dòng tế bào HEK 3T3.

Một trong những đặc tính độc lực quan trọng nhất của haemolysin và enterotoxin ở aeromonads liên quan đến khả năng gây độc tế bào *in vitro* (Ghatak *et al.*, 2006). Kết quả nhuộm và soi dưới kính hiển vi khi dòng tế bào HEK 3T3 tiếp xúc với dịch tế bào đã pha loãng ở tỷ lệ 1:4 đã gây chết >50% tế bào và làm thay đổi về mặt hình thái như làm tròn, gây co rút của tế bào chất.

Bảng 4. Kết quả biểu hiện ra ngoài của một số yếu tố gây độc của các chủng *Aeromonas* phân lập từ vết loét “bã đậu” ở ba ba (tính theo %).

Yếu tố độc lực	Biểu hiện	Kết quả (n = 8)
Hemolysin	Xuất hiện vùng vàng sáng xung quanh khuẩn lạc (tan máu dạng α và β)	8 (100%)
DNAase	Bảng DNA bị mờ hoặc smear	6 (75%)
Protease	Xuất hiện vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc	6 (75%)
Gây độc tế bào	Tế bào bị co rút tế bào chất và tròn lại	5 (62,5%)
Elastase	Xuất hiện vùng trong suốt xung quanh khuẩn lạc	2 (25%)

Phát hiện gen độc tố của *Aeromonas*

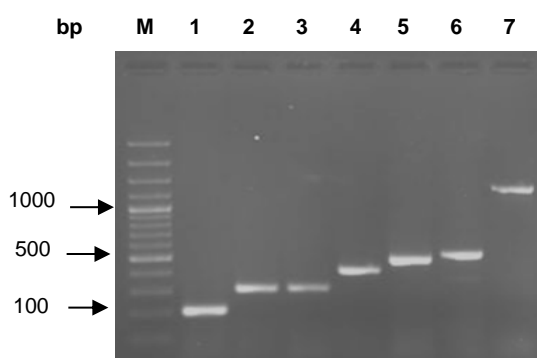
Việc phát hiện các yếu tố độc lực thông qua sự hiện diện của các gen và/hoặc hoạt động kiểu hình của chúng ở đã trở thành một thước đo quan trọng và phổ biến để đánh giá độc lực và khả năng gây bệnh của một số loài thuộc chi *Aeromonas* (Hoel *et al.*, 2017; da Silva *et al.*, 2017). Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã đánh giá 7 gen mã hóa cho các yếu tố gây độc (gọi tắt là gen độc tố) trong 8 chủng *Aeromonas* spp. đã phân lập. Kết quả cho thấy cả 8 chủng này đều có ít nhất 4 gen độc tố. *Aeromonas veroni* VTCC 70168 mang cả 7/7 gen độc tố. Bên cạnh đó, hai chủng *A.*

hydrophila subsp. *hydrophila* VTCC 70165 và VTCC 70167 đều có 6/7 gen độc tố. Trong số 7 gen, 2 gen *exu* và *ser* phân bố rộng rãi trong tất cả các chủng *Aeromonas* spp. đã phân lập. Ở cả 4 chủng thuộc loài *A. jandaei* đều không có mặt của 3 gen *alt*, *ast* và *hlyA*. Trong khi 2 chủng thuộc loài *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* lại không có mặt của *aer* (Bảng 5). Các gen mã hóa cho các ngoại độc tố như *alt* và *ast* ít phổ biến hơn ở các chủng đã phân lập ngoại trừ hai chủng thuộc loài *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*. Kết quả thu được là tương tự với kết quả nghiên cứu của Khor *et al.*, 2015.

Bảng 5. Sự phân bố của các gen mã hóa cho các yếu tố gây độc ở các loài thuộc chi *Aeromonas* phân lập từ vết loét “bã đậu”.

Yếu tố gây độc	Số lượng các chủng mang gen mã hóa cho các yếu tố gây độc (%)			
	<i>A. jandaei</i> (n = 4)	<i>A. hydrophila</i> sbsp. <i>hydrophila</i> (n = 2)	<i>A. veronii</i> (n = 2)	Tổng số (n = 8)
Aerolysin/hemolysin (<i>aer</i>)	4 (100)	0 (0)	2 (100)	6 (75)
Heat-labile cytotoxic enterotoxin (<i>alt</i>)	0 (0)	2 (100)	1 (50)	3 (37,5)
Heat-stable cytotoxic enterotoxin (<i>ast</i>)	0 (0)	2 (100)	2 (100)	4 (50)
Elastase (<i>ela</i>)	3 (75)	2 (100)	2 (100)	7 (87,5)
DNAase (<i>exu</i>)	4 (100)	2 (100)	2 (100)	8 (100)
Hemolysin (<i>hlyA</i>)	0 (0)	2 (100)	1 (50)	3 (37,5)
Serine protease (<i>ser</i>)	4 (0)	2 (100)	2 (100)	8 (100)

Hình 2 là ảnh điện di sản phẩm PCR của các gen độc tố ở chủng đại diện *A. veronii* VTCC 70168. Kết quả cho thấy, chủng này mang cả 7 gen độc tố. Nghiên cứu của Oliveira *et al.* (2012) và Mzula *et al.* (2020) đã cho thấy rằng sự hiện diện các gen gây độc có mối liên quan chặt chẽ đến khả năng gây bệnh trên động vật của các chủng *Aeromonas* spp. Tỷ lệ chết của động vật thủy sản cao hơn khi bị xâm nhiễm bởi các chủng mang nhiều gen độc tố. Tuy nhiên, sự khác biệt về thành phần các gen gây độc ở mỗi chủng loài *Aeromonas* phân lập được cho thấy chúng có cơ chế xâm nhiễm và gây độc khác nhau ở vật chủ (Mzula *et al.*, 2020).



Hình 2. Ảnh điện di sản phẩm PCR của 7 gen độc tố ở chủng *A. veronii* VTCC 70168. Giếng 1-*ser* (211 bp), 2- *alt* (320 bp), 3- *exu* (323 bp), 4-*ast* (431 bp), 5- *ast* (504 bp), 6- *ela* (513 bp), 7- *hlyA* (1320 bp), M- Thang chuẩn 100 bp DNA ladder.

KẾT LUẬN

Các loài vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* bao gồm *A. jandaei*, *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* và *A. veronii* được xác định là thành phần chính trong vết loét “bã đậu” trên ba ba nuôi ở Nam Định. Sự có mặt phổ biến của các gen gây độc trên các loài thuộc chi *Aeromonas* đã chỉ ra nguy cơ gây độc tiềm ẩn đối với ba ba. Trong thời gian tới, cần có các nghiên cứu nhằm chứng minh các loài vi khuẩn thuộc chi *Aeromonas* là căn nguyên chính gây bệnh “bã đậu” trên ba ba cũng như phát triển quy trình chẩn đoán, phát hiện sớm các yếu tố nguy cơ gây bệnh nhằm giảm thiểu những rủi ro cho người nuôi.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài “Xây dựng cơ sở dữ liệu nguồn gen vi sinh vật chất lượng cao và phát triển sản phẩm công nghệ sinh học từ vi sinh vật ứng dụng trong trồng trọt, chăn nuôi và bảo vệ môi trường” (Mã số NVQG-2021/ĐT.07) do Bộ Khoa học và Công nghệ tài trợ. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdelhamed H, Ibrahim I, Won S, Banes MM, Wills RW, Karsi A, Lawrence ML (2017) Evaluation of three recombinant outer membrane proteins, OmpA1, Tdr, and TbpA, as potential vaccine antigens against virulent *Aeromonas hydrophila* infection in channel cat fish (*Ictalurus punctatus*). *Fish Shellfish Immunol* 66: 480–486.
- Benson HJ (2002) *Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology*, 8th ed. McGraw-Hill. U.S.A., 478 pages.
- Chen J, Ding X, Zhu N, Kong L, He Z (2015) Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas* species from diseased Chinese soft-shelled turtles (*Trionyx sinensis*). *Aquac Res* 46: 1527–1536.
- Chen J, Zhu N, Kong L, Bei Y, Zheng T, Ding X, He Z (2013) First case of soft-shell disease in Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) associated with *Aeromonas sobria*-*A. veronii* complex. *Aquaculture* 406: 62–67.
- Chung TH, Yi SW, Kim BS, Kim WI, Shin GW (2017) Identification and antibiotic resistance profiling of bacterial isolates from septicemic soft-shelled turtles (*Pelodiscus sinensis*). *Vet Med* 62: 169–177.
- da Silva LCA, Leal-Balbino TC, de Melo BST, Mendes-Marques CL, Rezende AM, de Almeida AMP, Leal NC (2017) Genetic diversity and virulence potential of clinical and environmental *Aeromonas* spp. isolates from a diarrhea outbreak. *BMC Microbiol* 17: 179.
- Fernandez-Bravo A, Figueras MJ (2020) An update on the genus *Aeromonas*: taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Miroorganisms* 8: 129.
- Gerceker D, Karasartova D, Elyürek E, Barkar S, Kiyan M, Özsan TM, Calgin MK, Sahin F (2009) A new, simple, rapid test for detection of DNase activity of microorganisms: DNase Tube test. *J Gen Appl Microbiol* 55: 291–294.
- Ghatak S, Agarwal RK, Bhilegaonkar KN (2006) Comparative study of cytotoxicity of *Aeromonas* spp. on four different cell lines. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 29: 233–241.
- Hoel S, Vadstein O, Jakobsen AN (2017) Species distribution and prevalence of putative virulence factors in mesophilic *Aeromonas* spp. isolated from fresh retail sushi. *Front Microbiol* 8: 931.
- Ip Y, Lee S, Wong W, Chew S (2013) The Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*, decreases nitrogenous excretion, reduces urea synthesis and suppresses ammonia production during emersion. *J Experimental Biol* 216: 1650–1657.
- Khor WC, Puah SM, Tan JAMA, Puthucheary SD, Chua KH (2015) Phenotypic and genetic diversity of *Aeromonas*

- species isolated from fresh water lakes in Malaysia. *PLoS ONE* 10: e0145933.
- Li X, Kang Y, Zhang X, Zhu B, Fang W (2012) Identification of a heat shock cognate protein 70 gene in Chinese soft-shell turtle (*Pelodiscus sinensis*) and its expression profiles under thermal stress. *J Zhejiang Univ Sci B* 13: 465–477.
- Mzula A, Wambura PN, Mdegela RH, Shirima GM (2019) Current state of modern biotechnological-based *Aeromonas hydrophila* vaccines for aquaculture: a systematic review. *Biomed Res Int*: 1–11.
- Oliveira STL, Veneroni-Gouveia G, Costa MM (2012) Molecular characterization of virulence factors in *Aeromonas hydrophila* obtained from fish. *Pesqui. Vet Bras* 32: 701–706.
- Smith MD, Wuthiekanun V, Walsh AL, White NJ (1995) Quantitative recovery of *Burkholderia pseudomallei* from soil in Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 89: 488–490.
- Sreedharan K, Philip R, Singh ISB (2011) Isolation and characterization of virulent *Aeromonas veronii* from ascitic fluid of oscar *Astronotus ocellatus* showing signs of infectious dropsy. *Dis Aquat Org* 94: 29–39.
- Xiao G, Wang P, Liu M, Jiang X, Liu Y, Deng S (2011) Isolation, identification and drug sensitive test of *Aeromonas hydrophila* from Chinese soft-shelled turtle. *J Econ Anim* 15: 56–60.

BACTERIAL COMPOSITION ISOLATED FROM ULCERS “BA DAU” OF SOFT-SHELLED TURTLES (*Pelodiscus sinensis*) IN NAM DINH FARM AND CHARACTERIZATION OF *Aeromonas* spp. VIRULENCE

Hoang Thi Lan Anh¹, Bui Nguyen Hai Linh¹, Nguyen Huu Tuan Dung¹, Le Thi Thanh Hue¹, Nguyen Viet Ha¹, Luong Minh Cuong², Trinh Thanh Trung¹

¹Institute of Microbiology and Biotechnology, Vietnam National University, Hanoi

²Hung Ban Co. Ltd

SUMMARY

Pelodiscus sinensis is a widespread species of soft-shelled turtle that is commercially cultured in freshwater and prominently exploited as speciality food in Vietnam. During the cultivation, there are distinctly recurrent epidemic diseases causing economically vast damage for farmers. In this research, we carried out the isolation of microorganisms from typical ulcers “ba dau” presenting on soft-shelled turtle taken in Nam Dinh farm. The samples were inoculated on common media used for bacteria, actinomyces, fungus and yeast. Only bacteria grew on typical culture medium. Fifteen bacterial strains were isolated and identified by 16S rRNA sequence analysis. They were belonged to genera such as *Acidovorax* (n=1), *Acinetobacter* (n=1), *Aeromonas* (n=8), *Citrobacter* (n=1), *Chryseobacterium* (n=1), *Moraxella* (n=1), *Paludibacterium* (n=1) and *Parabacteroides* (n=1). In which, eight strains *Aeromonas* spp. were selected for further research on virulence characterization. PCR results showed that these strains possessed at least 4/7 virulence genes including *aer* (75%), *alt* (37.5%), *ast* (50%), *ela* (87.5%), *exu* (100%), *hlyA* (37.5%) and *ser* (100%). With additional tests, we confirmed the virulent expression by haemolysin (100%), protease (75%), DNAase (75%), elastase (25%) and cytotoxicity (62.5%). These results are scientific basis to establish and develop practical methods for controlling and preventing “ba dau” disease in the soft-shelled turtle in the future.

Keywords: *Aeromonas*, Chinese soft-shelled turtle (*Pelodiscus sinensis*), ulcer disease, virulence genes