

GENETIC DIVERSITY ON *Aeromonas hydrophila* ISOLATED FROM HEMORRHAGIC STRIPED CATFISH IN THE MEKONG DELTA

Quach Van Cao Thi^{1*}, Tran Quoc Dung², Tu Thanh Dung³

¹Vinh Long University of Technology Education

²Party Committee of Agencies and Enterprises of Vinh Long province

³Can Tho University

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Received: 31/10/2022 Revised: 30/01/2023 Published: 31/01/2023	This study was conducted to evaluate the genetic diversity of <i>Aeromonas hydrophila</i> isolates collected from striped catfish intensively farmed in the Mekong Delta. A total of 26 bacterial isolates were obtained from hemorrhagic disease-infected fish. All bacterial isolates were identified as <i>A. hydrophila</i> based on their morphological characterization, API 20E kit, and molecular biology technique. Twelve strains were selected as representatives for sequencing the aerolysin gene; these strains had high identities (96.64 – 100%) compared with reference strains of <i>A. hydrophila</i> on Genbank. Besides, these strains were used for analyzing genetic diversity. The results indicated that the isolates from Tien Giang and Tra Vinh had a close relationship and shared distant similarities with the strains from An Giang, Ben Tre, Dong Thap, and Vinh Long provinces. The study has found genetic differences between <i>A. hydrophila</i> isolates in two main groups representing two ecologically different areas of brackish and fresh water in the Mekong Delta.
KEYWORDS Aerolysin gene <i>Aeromonas hydrophila</i> Genetic diversity Mekong Delta Striped catfish	

ĐA DẠNG DI TRUYỀN CÁC CHỦNG VI KHUẨN *Aeromonas hydrophila* PHÂN LẬP TỪ CÁ TRA BỆNH XUẤT HUYẾT Ở ĐỒNG BẰNG SÔNG CỬU LONG

Quách Văn Cao Thi^{1*}, Trần Quốc Dũng², Từ Thanh Dung³

¹Trường Đại học Sư phạm Kỹ thuật Vĩnh Long

²Đảng ủy Khối Cơ quan và Doanh nghiệp tỉnh Vĩnh Long

³Trường Đại học Cần Thơ

THÔNG TIN BÀI BÁO	TÓM TẮT
Ngày nhận bài: 31/10/2022 Ngày hoàn thiện: 30/01/2023 Ngày đăng: 31/01/2023	Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền của các chủng vi khuẩn <i>Aeromonas hydrophila</i> phân lập từ cá tra nuôi thâm canh ở Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL). Tổng số 26 chủng vi khuẩn được phân lập từ cá tra mắc bệnh xuất huyết. Tất cả các chủng vi khuẩn phân lập được định danh là <i>A. hydrophila</i> dựa trên kết quả quan sát các đặc điểm hình thái, kết hợp kiểm tra sinh hóa bằng bộ kit API 20E và kỹ thuật sinh học phân tử. Mười hai chủng <i>A. hydrophila</i> được chọn làm đại diện để giải trình tự đoạn gen aerolysin. Kết quả cho thấy, các chủng vi khuẩn phân lập đều có độ tương đồng cao từ 96,64 - 100% so với các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> đã được công bố trên ngân hàng gen. Ngoài ra, kết quả giải trình tự các chủng vi khuẩn này còn được dùng để phân tích sự đa dạng di truyền. Kết quả cho thấy, các chủng vi khuẩn ở Tiền Giang và Trà Vinh có mối quan hệ di truyền gần gũi với nhau nhưng hình thành nhóm riêng với các chủng phân bố ở các tỉnh An Giang, Bến Tre, Đồng Tháp và Vĩnh Long. Nghiên cứu đã tìm thấy sự khác biệt di truyền giữa các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> ở hai nhóm đại diện cho vùng sinh thái nước lợ và nước ngọt ở ĐBSCL.
TỪ KHÓA <i>Aeromonas hydrophila</i> Cá tra Đa dạng di truyền Đồng bằng sông Cửu Long Gene aerolysin	

DOI: <https://doi.org/10.34238/tnu-jst.6831>

* Corresponding author. Email: thiqvc@vlute.edu.vn

1. Giới thiệu

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là một trong những đối tượng thủy sản nước ngọt xuất khẩu chính ở vùng ĐBSCL. Trong thời gian qua, việc mở rộng diện tích và thâm canh hóa với mật độ nuôi cao để tăng sản lượng đã tạo điều kiện cho các bệnh nguy hiểm bùng phát mạnh mẽ trên đối tượng nuôi này. Trong số đó, bệnh xuất huyết được các nhà khoa học xác định là do vi khuẩn *A. hydrophila* [1]. Sự xuất hiện và bùng phát của bệnh này trong ao nuôi là 1 trong những nguyên nhân dẫn đến các tổn thất cho người nuôi [2]. Đây là loài vi khuẩn di động, có hình que ngắn, Gram âm và yếm khí tùy tiện. Ở Việt Nam, ngoài cá tra thì vi khuẩn này cũng được báo cáo là tác nhân gây bệnh xuất huyết trên các loài cá khác như cá thát lát còm (*Chitala Chitala*) [3] và trên lươn đồng (*Monopterus albus*) [4].

Cho đến nay, kháng sinh vẫn là lựa chọn ưu tiên để điều trị bệnh xuất huyết do vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá tra. Việc sử dụng thuốc kháng sinh không theo khuyến cáo của nhà sản xuất đã gây ra hiện tượng kháng thuốc ở vi khuẩn trong môi trường ao nuôi [5], [6]. Kết quả làm cho hiệu quả điều trị thấp và tốn nhiều chi phí hơn. Do đó, xu hướng sử dụng vaccine phòng bệnh trong ngành nuôi cá tra là hướng đi mới ở Việt Nam nhằm hạn chế sử dụng kháng sinh, giảm chi phí sản xuất và đảm bảo an toàn vệ sinh thực phẩm. Cho đến nay, trên thế giới đã có nhiều nỗ lực để tăng cường hiệu quả phòng bệnh của vaccine đối với *A. hydrophila* trên nhiều loài cá [7]. Ở Việt Nam, việc phát triển vaccine phòng bệnh do *A. hydrophila* đã được nghiên cứu nhưng hiệu quả chưa cao. Điều này có thể do tính không đồng nhất về mặt di truyền của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* [8]. Sự biến đổi di truyền của vi khuẩn đã được chứng minh là rất đa dạng và có sự khác biệt giữa các vùng địa lý mà chúng sinh sống [9]. Vì vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm làm sáng tỏ mối quan hệ di truyền của vi khuẩn *A. hydrophila* thu thập từ cá tra nhiễm bệnh xuất huyết ở 1 số tỉnh của ĐBSCL. Đây là cơ sở khoa học để nghiên cứu sản xuất các loại vaccine phòng bệnh xuất huyết trên cá tra.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên vật liệu

Thu mẫu cá tra nhiễm bệnh xuất huyết từ các ao nuôi ở ĐBSCL để phân lập vi khuẩn *A. hydrophila*. Cá tra nhiễm bệnh xuất huyết có các dấu hiệu phổ biến như xoang bụng tích dịch, bụng trương to, xuất hiện các đốm xuất huyết đỏ trên thân, ở các gốc vây, quanh miệng và hậu môn (Hình 1).



Hình 1. Dấu hiệu bên ngoài (a) và bên trong (b) của cá tra nhiễm bệnh xuất huyết

2.2. Phương pháp phân lập và tách rông vi khuẩn

Dựa theo tài liệu của Frerich và Millar (1993) [10] và Buller (2014) [11], vi khuẩn được phân lập và tách rông (thuần) trên thạch TSA từ các cơ quan như gan, thận và tỳ tạng của cá bệnh. Trong quá trình phân lập, vi khuẩn được ủ ở 28–30°C trong 24 giờ. Mẫu vi khuẩn rông sẽ được trữ trong môi trường chứa 20% glycerol và giữ ở -80°.

2.3. Phương pháp xác định vi khuẩn

2.3.1. Kiểm tra đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa

Một số đặc điểm của khuẩn lạc, sinh lý và sinh hóa cơ bản như nhuộm Gram, phản ứng oxidase, catalase, tính di động và khả năng lên men glucose (phản ứng O/F) của vi khuẩn *A. hydrophila* được kiểm tra theo Cowan và Steel [12] và Buller (2014) [11]. Bên cạnh đó, nghiên cứu sử dụng bộ kit API 20E (bioMerieux, Pháp) để định danh vi khuẩn.

2.3.2. Phương pháp định danh vi khuẩn bằng kỹ thuật PCR

ADN vi khuẩn được chiết tách dựa theo quy trình của Bartie và cộng sự (2006) [13]. Các bước ly trích được thực hiện như sau: hút dịch tăng sinh vi khuẩn cho vào ống nghiệm chứa dung dịch TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0). Sau đó, đun nóng ở nhiệt độ 95°C trong thời gian 15 phút. Hỗn hợp được làm lạnh trong nước đá và sau cùng, ly tâm hỗn hợp trong thời gian 2 phút ở tốc độ 14.000 vòng/phút để thu lấy ADN. Sử dụng kỹ thuật PCR để khuếch đại gen aerolysin của vi khuẩn bằng cặp mồi có trình tự là AeroFd: 5'-CCAAGGGGTCTGTGGCGACA-3' và AeroRs: 5'-TTTCACCGGTAACAGGATTG-3' [14]. Phản ứng PCR được thực hiện với các thành phần gồm: nước cất hai lần (BiH₂O), 1X PCR Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,5 µl dNTPs (200 µM), 10-20 pmol mồi xuôi, 10-20 pmol mồi ngược, 2,5 UI Taq DNA polymerase và 20-40 ng mẫu ADN. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR được thực hiện gồm: giai đoạn biến tính đầu tiên ở 95°C trong thời gian 4 phút, tiếp theo thực hiện biến tính ở 95°C trong thời gian 30 giây, bắt mồi ở 60°C trong thời gian 45 giây, kéo dài chuỗi ở 72°C trong thời gian 30 giây và giai đoạn kéo dài sau cùng ở nhiệt độ 72°C trong thời gian 10 phút [15]. Sản phẩm PCR được khuếch đại và kiểm tra trên gel agarose có kích thước là 209 bp.

2.4. Phương pháp phân tích đa dạng di truyền

Mười hai chủng vi khuẩn đại diện được chọn để gửi xác định trình tự nucleotide ở công ty MacroGen của Hàn Quốc. Sử dụng chương trình BLASTn để phân tích độ tương đồng (identity) trình tự nucleotide chủng vi khuẩn phân lập với trình tự các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* trên ngân hàng NCBI (the National Center for Biotechnology Information). Các trình tự ADN sau đó được xếp hàng (multialignment) bằng phương pháp CLUSTAL W [16]. Cây phả hệ (phylogenetic tree) thể hiện mối quan hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn được xây dựng bằng phần mềm MEGAX (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) dựa trên thuật toán Neighbour-joining [17] với giá trị bootstrap là 1.000 lần lặp lại [18].

3. Kết quả và thảo luận

3.1. Kết quả phân lập và xác định vi khuẩn

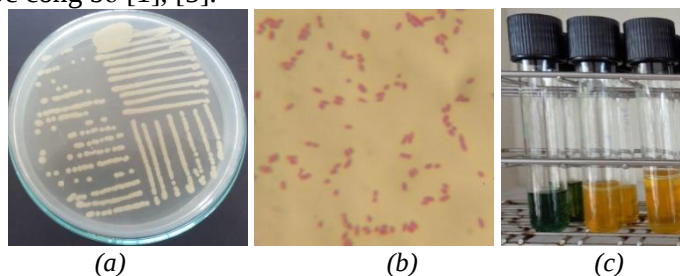
3.1.1. Kết quả phân lập và tách rông vi khuẩn

Từ 32 mẫu cá tra nhiễm bệnh xuất huyết thu thập ở 6 tỉnh thuộc vùng ĐBSCL, nghiên cứu phân lập được 26 chủng vi khuẩn *A. hydrophila*. Mười hai chủng vi khuẩn được chọn để phân tích đa dạng di truyền có ký hiệu là 1A3, 2A3, 4A3, 5A3, 6A3, 7A3, 10A3, 11A3, 16A3, 18A3, 19A3, 23A3 và 24A3.

3.1.2. Đặc điểm vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập

Kết quả kiểm tra vi khuẩn *A. hydrophila* phân lập cho thấy khuẩn lạc có dạng tròn với đường kính dao động từ 1-3 mm. Trên môi trường TSA, khuẩn lạc có màu vàng nhạt đến màu vàng kem (Hình 2a) sau 24 giờ ủ. Vi khuẩn có khả năng di động, cho kết quả Gram âm và có hình que ngắn (Hình 2b). Bên cạnh đó, kết quả khảo sát cho thấy 26 chủng vi khuẩn cho hoạt tính oxidase và catalase dương tính. Ngoài ra, ở điều kiện hiếu khí và yếm khí thì các chủng vi khuẩn kiểm tra đều lên men được đường glucose (Hình 2c). Như vậy, qua kết quả kiểm tra cho thấy, các chủng

vi khuẩn được phân lập từ cá tra nhiễm bệnh xuất huyết tương tự với các đặc điểm của vi khuẩn *A. hydrophila* đã được công bố [1], [5].



(a) (b) (c)

Hình 2. Kết quả phân lập vi khuẩn

(a): Vi khuẩn phân lập có màu vàng khi phát triển trên thạch TSA sau 24 giờ ủ ở 28°C, (b): Vi khuẩn có hình que ngắn qua kết quả nhuộm Gram (100X), (c): Phản ứng O/F (màu vàng chỉ vi khuẩn dương tính).

3.1.3. Kết quả định danh vi khuẩn *A. hydrophila* bằng bộ kit API 20E

Kết quả định danh bằng bộ kit API 20E cho thấy các chủng vi khuẩn phân lập có các phản ứng tương tự với vi khuẩn *A. hydrophila* đã được công bố [1], [19]. Vi khuẩn cho phản ứng dương tính với Voges-Proskauer, arginine, orthonitrophenyl galactosidase, lysine, gelatin, saccharose, glucose, amygdalin và mannitol. Trong khi đó, vi khuẩn cho phản ứng âm tính với citrate, ornithine, urease, H₂S, tryptophane deaminase, sorbitol, indole, inositol, rhamnose, melibiose và arabinose. Tuy nhiên, các chủng vi khuẩn trong nghiên cứu có 1 số phản ứng khác với vi khuẩn *A. hydrophila* gây bệnh nhiễm trùng huyết trên cá nheo Mỹ của Pridgeon và Klesius (2011) [20]. Nghiên cứu của Pridgeon và Klesius (2011) [20] cho thấy vi khuẩn *A. hydrophila* dương tính với indole, citrate, saccharose, inositol và arabinose, trong khi vi khuẩn âm tính với lysine decarboxylase và amygdalin. Kết quả khác biệt trên có thể do vi khuẩn được phân lập từ các môi trường sống khác nhau.

3.1.4. Định danh vi khuẩn *A. hydrophila* bằng kỹ thuật sinh học phân tử

Nghiên cứu sử dụng kỹ thuật để định danh, qua phản ứng PCR cho thấy 26/26 chủng vi khuẩn đều khuếch đại được gen aerolysin với kích thước sản phẩm là 209 bp (Hình 3). Gen aerolysin được sử dụng để xác định loài *A. hydrophila* gây bệnh xuất huyết đã được nhiều tác giả thực hiện [21]-[23] đối với nhiều động vật thủy sản trên thế giới. Nghiên cứu của Panangala và cộng sự (2007) đã sử dụng kỹ thuật PCR đa môi (multiplex PCR) để phát hiện cùng lúc 3 loài vi khuẩn gây bệnh là *A. hydrophila*, *E. ictaluri* và *F. columnare* trên cá nheo Mỹ [15]. Ngoài ra, với kỹ thuật PCR, Nguyễn Hà Giang và cộng sự (2010) cũng đã thành công trong việc chẩn đoán loài *A. hydrophila* từ thận cá tra bệnh xuất huyết với độ nhạy và tính đặc hiệu tương đối cao [24]. Kết quả giải trình tự của 12 chủng vi khuẩn đại diện cho thấy chúng tương đồng từ 96,64 - 100% với vi khuẩn *A. hydrophila* trên ngân hàng gen.



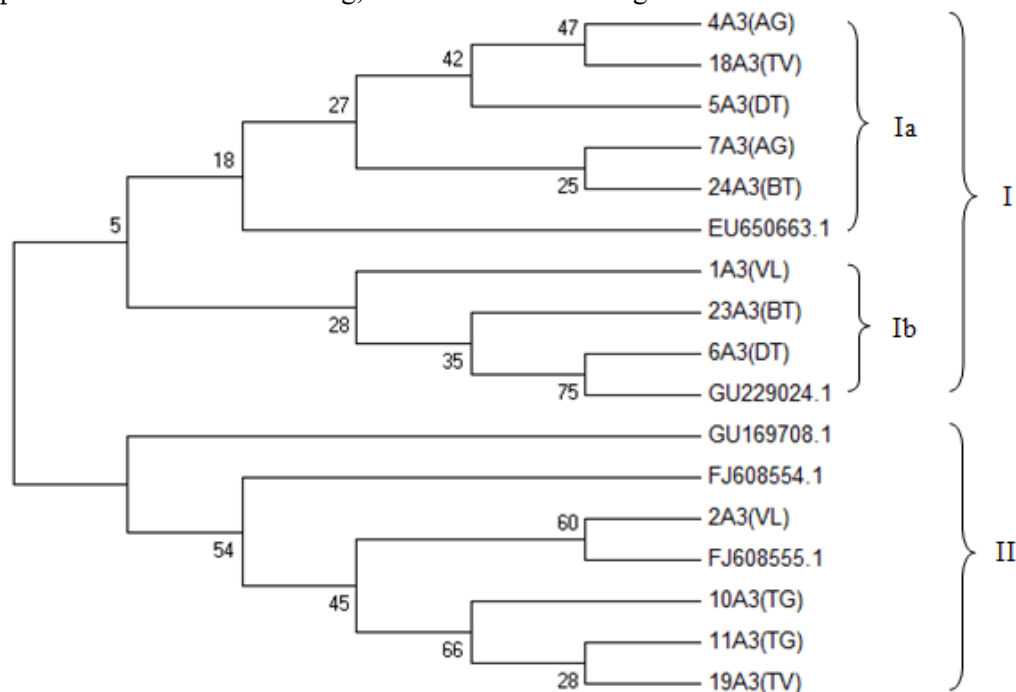
- M: thang chuẩn ADN 100 bp (Invitrogen)
- Giếng 4: đối chứng âm
- Giếng 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 và 16 lần lượt là các chủng vi khuẩn: 1A3, 2A3, 4A3, 5A3, 6A3, 7A3, 10A3, 11A3, 16A3, 18A3, 19A3, 23A3 và 24A3

Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định vi khuẩn *A. hydrophila*

3.2. Mối quan hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn *A. hydrophila*

Dựa vào 12 trình tự gen của vi khuẩn đại diện và 5 trình tự của vi khuẩn *A. hydrophila* từ ngân hàng dữ liệu NCBI, đề tài đã thiết lập mối quan hệ di truyền giữa các chủng vi khuẩn (Hình 4). Qua kết quả Hình 3 cho thấy, cây phả hệ phân thành 2 nhóm lớn (cluster). Nhóm I gồm 8

chủng 24A3, 18A3, 4A3, 5A3, 1A3, 6A3, 23A3 và 7A3, phân bố ở các tỉnh Bến Tre, An Giang, Trà Vinh, Đồng Tháp và Vĩnh Long. Trong khi đó, nhóm II gồm 4 chủng 2A3, 10A3, 11A3 và 19A3, phân bố ở các tỉnh Tiền Giang, Trà Vinh và Vĩnh Long.



Hình 4. Cây phả hệ thể hiện mối quan hệ di truyền của các chủng *A. hydrophila*

Nhóm I phân thành 2 nhóm Ia và nhóm Ib (Hình 4). Nhóm Ia gồm 5 chủng 24A3, 18A3, 4A3, 5A3 và 7A3, phân bố ở các tỉnh Đồng Tháp, Bến Tre, Trà Vinh và An Giang, có quan hệ gần với loài *A. hydrophila* AH14 (EU650663.1) trên ngân hàng dữ liệu NCBI. Trong nhóm này, các chủng 4A3, 5A3 và 18A3 từ Đồng Tháp, An Giang và Trà Vinh có mối quan hệ về mặt di truyền gần gũi nhất, đặc biệt là 2 chủng 7A3 và 24A3 ở An Giang và Bến Tre không khác biệt di truyền (Bảng 3). Trong khi đó, nhóm Ib gồm 3 chủng 1A3, 6A3 và 23A3 phân bố ở Đồng Tháp, Vĩnh Long và Bến Tre. Trong nhóm này, chủng 6A3 ở Đồng Tháp có mối quan hệ di truyền gần gũi với chủng *A. hydrophila* wp3 (GU229024.1) so với chủng 1A3 (Vĩnh Long) và 23A3 ở Bến Tre, chỉ số khác biệt 0,023. Tuy nhiên, khoảng cách di truyền giữa chủng 6A3 và các chủng còn lại tương đối lớn (0,487 - 0,505), cho thấy chủng 6A3 khác biệt về mặt di truyền so với các chủng khác.

Nhóm II gồm 4 chủng: 2A3, 10A3, 11A3 và 19A3 (Hình 4). Trong đó, chủng 2A3 ở Vĩnh Long có phần trăm tương đồng 100% so với chủng *A. hydrophila* ZC1 (FJ608555.1) trên ngân hàng dữ liệu tạo thành 1 nhóm riêng biệt và nhóm gồm 3 chủng 10A3, 11A3 và 19A3 phân bố ở 2 tỉnh Tiền Giang và Trà Vinh đều là các tỉnh có môi trường nước lợ ở ven biển tạo thành một nhóm riêng liên kết chặt chẽ và gần gũi về mặt di truyền với mức khác biệt 0%. Ngoài ra, các chủng trong nhóm II đều có quan hệ di truyền gần gũi với 1 số chủng *A. hydrophila* FJ608554.1 và GU169708.1 trên ngân hàng dữ liệu ở mức tương đồng 99%.

Một số nghiên cứu dựa trên đoạn gen aerolysin để đánh giá sự đa dạng di truyền của loài *A. hydrophila* ở những vùng địa lý và trên các vật chủ khác nhau với kết quả là các chủng vi khuẩn có mối quan hệ di truyền gần gũi với nhau, mặc dù phân bố ở các nguồn khác nhau [23]. Tương tự, Das và cộng sự (2005) [25] đã nghiên cứu sự đa dạng di truyền dựa trên protein của các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* thu thập từ cá nước ngọt và cho kết quả có mối quan hệ di truyền giữa các chủng có nguồn gốc và vị trí thu mẫu khác nhau. Thêm vào đó, nhiều nghiên cứu trên thế giới đã khảo sát sự đa dạng di truyền của vi khuẩn *Aeromonas* spp. dựa trên các gen khác như gen 16S

rRNA, gen *gyrB* và *rpoD* [26] và kết quả cho thấy các gen trên là thích hợp để thiết lập mối quan hệ di truyền trên các loài vi khuẩn.

Trong nghiên cứu này, các chủng vi khuẩn *A. hydrophila* có nguồn gốc từ An Giang, Vĩnh Long, Trà Vinh và Đồng Tháp có quan hệ di truyền gần nhau là do điều kiện địa lý và khí hậu ở các tỉnh ĐBSCL khá giống nhau. Mặt khác, nhiều hộ sản xuất cá tra thương phẩm chọn cá giống từ các cơ sở sản xuất giống ngoài tỉnh, nguồn gốc cá tra giống không rõ ràng được cung cấp rộng rãi đến các tỉnh khác nhau ở ĐBSCL. Do đó, cá giống có khả năng mang cả mầm bệnh (như *A. hydrophila*) đến nhiều nơi khác nhau và ranh giới địa lý của các chủng vi khuẩn là không thể xác định, mầm bệnh được mang đi nhưng vẫn giữ các đặc điểm về di truyền vốn có của nó. Đặc biệt, chủng 6A3 ở Đồng Tháp khác biệt nhiều so với các chủng khác có thể do biến đổi di truyền. Đây là một yếu tố quan trọng góp phần vào sự đa dạng di truyền trong loài của vi khuẩn *A. hydrophila*. Tuy nhiên, các chủng ở vùng nước lợ và nước ngọt phân bố thành 2 nhóm riêng biệt trên giản đồ phả hệ. Kết quả này cho thấy sự khác biệt vùng sinh thái đã ảnh hưởng đến sự đa dạng di truyền và tạo nên sự khác biệt di truyền giữa các chủng vi khuẩn *A. hydrophila*. Điều này có thể là do người nuôi chủ yếu sử dụng nguồn nước sông tại vùng phục vụ cho sản xuất cá tra nên điều kiện sống của vi khuẩn vùng nước ngọt và nước lợ khác nhau dẫn đến khác biệt di truyền các chủng vi khuẩn [27]. Tương tự, nghiên cứu của Trần Ngọc Được và cộng sự (2013) [9] cho thấy các chủng vi khuẩn lactic cũng có sự khác biệt di truyền khi phân bố ở các khu vực sinh thái khác nhau ở ĐBSCL.

Kết quả phân tích các chủng *A. hydrophila* ở ĐBSCL cho thấy sự đa dạng di truyền, quá trình thích nghi với môi trường sống và tồn tại đã gây nên sự biến đổi gen và dẫn đến sự không đồng nhất về mặt di truyền giữa các chủng vi khuẩn ở môi trường nước lợ và nước ngọt. Camus và cộng sự (1998) [28] cho rằng sự đa dạng di truyền giữa các chủng *A. hydrophila* đã ngăn cản việc phát triển các loại vaccine chống lại sự lây nhiễm của vi khuẩn *A. hydrophila*. Do đó, nhiều nhà khoa học đề xuất nên nghiên cứu kháng nguyên chung của các chủng *A. hydrophila* để sản xuất vaccine có hiệu lực và hiệu quả [29]. Tóm lại, phương pháp nghiên cứu trên đoạn gen aerolysin có khả năng tìm ra sự đa dạng di truyền hay sự biến đổi gen trong cùng loài của vi khuẩn *A. hydrophila* phân bố trên những vùng sinh thái khác nhau. Tuy nhiên, cần so sánh và kết hợp việc nghiên cứu sự biến đổi di truyền của vi khuẩn *A. hydrophila* trên nhiều đoạn gen khác nhau [30].

4. Kết luận

Nghiên cứu đã phân lập và định danh được 26 chủng vi khuẩn *A. hydrophila* từ cá tra nhiễm bệnh xuất huyết ở ĐBSCL. Các chủng vi khuẩn ở Tiền Giang và Trà Vinh có quan hệ di truyền gần nhau nhưng chúng có khoảng cách di truyền xa với các chủng phân bố ở các tỉnh Bến Tre, Đồng Tháp, An Giang và Vĩnh Long. Nghiên cứu cho thấy khác biệt di truyền giữa các chủng *A. hydrophila* đại diện cho vùng sinh thái nước lợ và nước ngọt ở ĐBSCL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO/ REFERENCES

- [1] L. T. T. Ly, D. N. Nguyen, P. H. Vo, and C. V. Doan, "Hemorrhage Disease of Cultured Tra Catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) in Mekong Delta," (in Vietnamese), *The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgah*, vol. 61, no. 3, pp. 215-224, 2009.
- [2] T. P. Nguyen, H. V. Nguyen, T. M. Bui, L. T. Phan, V. M. Son, L. N. Nguyen, T. T. T. Nguyen, G. J. Gooley, B. A. Ingram, and S. S. De Silva, *Better management practices for striped catfish (tra) farming in the Mekong Delta*, (version 3.0), Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok, Thailand, 2011.
- [3] H. T. M. Tran, "Study on the causative agent of haemorrhagic disease in sardines (*Chitala chitala* Hamilton, 1822)," (in Vietnamese), The 4th National Young Scientific Conference of Fisheries Industry, University of Agriculture and Forestry, Ho Chi Minh City, 2013.
- [4] O. T. H. Duong, "Isolation and determination of the hemorrhagic disease in rice eel (*Monopterus albus*) of *Aeromonas hydrophila*," (in Vietnamese), *Scientific Journal of Can Tho University*, no. 22, pp. 173-182, 2012.

- [5] S. Sarter, H. N. K. Nguyen, H. T. Lam, J. Lazard, and D. Montet, "Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from framed catfish," *Food Control*, vol. 18, pp. 1391-1396, 2007.
- [6] M. Nawaz, A. A. Khan, S. Khan, K. Sung, and R. Steele, "Isolation and characterization of tetracycline-resistant *Citrobacter* spp. from catfish," *Food Microbiology*, vol. 25, pp. 85-91, 2008.
- [7] W. P. Julia and H. K. Phillip, "Development and efficacy of novobiocin and rifampicin-resistant *Aeromonas hydrophila* as novel vaccines in channel catfish and Nile tilapia," *Vaccine*, vol. 29, pp. 7896-7904, 2011.
- [8] S. Khashe, W. Hill, and J. M. Janda, "Characterization of *Aeromonas hydrophila* strains of clinical, animal and environmental origin expressing the O:34 antigen," *Current Microbiology*, vol. 33, pp. 101-108, 1996.
- [9] D. N. Tran, D. N. Tran, D. M. T. Bui, and K. T. Duong, "Survey of lactic acid bacteria biodiversity from batch rice in three ecological regions of the Mekong Delta," *Journal of Science Can Tho University*, vol. 25, pp. 58-66, 2013.
- [10] G. N. Frerichs and S. D. Millar, *Manual for the isolation and identification of fish bacterial pathogen*. Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland, p. 60, 1993.
- [11] N. B. Buller, *Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*, CABI Publishing, p. 920, 2014.
- [12] G. I. Barrow and R. K. A. Feltham, *Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, p. 262, 1993.
- [13] K. Bartie, O. T. H. Duong, G. Huys, C. Dickson, M. Cnockaert, J. Swings, P. T. Nguyen, and A. Teale, "Application of REP-PCR and PFGE for typing chloramphenicol-resistant bacteria isolated at aquaculture farms in the Mekong Delta," (in Vietnamese), *Journal of Biotechnology*, vol. 4, no. 1, pp. 31-40, 2006.
- [14] D. R. P. Ollard, W. M. Jonhson, H. Lior, S. D. Tyler, and K. R. Rozee, "Detection of the Aerolysin Gene in *Aeromonas hydrophila* by the Polymerase Chain Reaction," *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 28, pp. 2477-2481, 1990.
- [15] V. S. Panangala, C. A. Shoemaker, V. L. Van Santen, K. Dybvig and P. H. Klesius, "Multiplex-PCR for simultaneous detection of 3 bacterial fish pathogens, *Flavobacterium columnare*, *Edwardsiella ictaluri*, and *Aeromonas hydrophila*," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 74, pp. 199-208, 2007.
- [16] J. D. Thompson, T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin, and D. G. Higgins, "The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools," *Nucleic Acids Research*, vol. 25, pp. 4876-4882, 1997.
- [17] N. Saitou and M. Nei, "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees," *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, pp. 406-425, 1987.
- [18] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar, "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis," (Version 6.0), *Molecular Biology and Evolution*, vol. 30, pp. 2725-2729, 2013.
- [19] M. Crumlish, T. C. Phan, J. Koesling, T. T. Vu, and K. Gravnigene, "Experimental challenge studies in Vietnamese catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage), exposed to *Edwardsiella ictaluri* and *Aeromonas hydrophila*," *Journal of Fish Disease*, vol. 33, pp. 717-722, 2010.
- [20] J. W. Pridgeon and P. H. Klesius, "Molecular identification and virulence of three *Aeromonas hydrophila* isolates cultured from infected channel catfish during a disease outbreak in west Alabama (USA) in 2009," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 94, pp. 249-253, 2011.
- [21] A. H. Yousr, S. Napis, G. R. A. Rusul, and R. Son, "Detection of Aerolysin and Hemolysin Genes in *Aeromonas* spp. Isolated from Environmental and Shellfish Sources by Polymerase Chain Reaction," *ASEAN Food Journal*, vol. 14, no. 2, pp. 115-122, 2007.
- [22] V. Singh, G. Rathore, D. Kapoor, B. N. Mishra, and W. S. Lakra, "Detection of aerolysin gene in *Aeromonas hydrophila* isolated from fish and pond water," *Indian Journal of Microbiology*, vol. 48, pp. 453-458, 2008.
- [23] D. Umesha, R. P. Srinivasa, K. P. Prasad, A. K. Reddy, and K. N. Srinivas, "Aerolysin and Hemolysin Virulence Genes of *Aeromonas hydrophila* Isolated from Diseased Ornamental Freshwater. Oscarfish and Goldfish by Polymerase Chain Reaction," *International Journal of Advanced Science and Technology*, vol. 3, pp. 84-86, 2011.
- [24] G. H. Nguyen, N. Q. Tran, T. H. Le, and O. T. H. Duong, "Research and application of PCR procedure to diagnose *Aeromonas hydrophila* on the kidney of catfish (*Pangasianodon*

- hypophthalmus*),” (in Vietnamese), National Aquaculture Conference, University of Agriculture and Forestry, Ho Chi Minh City, 2009.
- [25] B. K. Das, S. K. Samal, B. Samantray, and P. K. Meher, “Protein fingerprinting profiles in different strains of *Aeromonas hydrophila* isolated from fresh water fish,” *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 21, pp. 587-591, 2005.
- [26] M. A. Yánñez, V. Catalán, D. Apráiz, M. J. Figueras, and A. J. Martínez-Murcia, “Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 53, pp. 875-883, 2003.
- [27] M. R. Chacón, M. J. Figueras, G. Castro-Escarpulli, L. Soler, and J. Guarro, “Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp.,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, vol. 84, no. 4, pp. 269-278, 2003.
- [28] A. C. Camus, R. M. Durborow, W. G. Hemstreet, R. L. Thune, and J. P. Hawke, *Aeromonas Bacterial Infections: Motile Aeromonad Septicemia* (No. 478). Southern Regional Aquaculture Center, 1998.
- [29] K. Y. Leung, L. S. Wong, K. W. Low, and Y. M. Sin, “Mini-Tn 5 induced growth-and protease-deficient mutants of *Aeromonas hydrophila* as live vaccines for blue gourami,” *Trichogaster trichopterus* (Pallas), *Aquaculture*, vol. 158, pp. 11-22, 1997.
- [30] M. Kupfer, P. Kuhnert, B. M. Korczak, R. Peduzzi, and A. Demarta, “Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA, *gyrB* and *rpoB* gene sequences,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 56, pp. 2743-2751, 2006.