

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.039

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ MẶN LÊN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA VI KHUẨN *Vibrio* spp. TRONG ĐIỀU KIỆN PHÒNG THÍ NGHIỆM

Phạm Thị Tuyết Ngân^{1*}, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên¹, Vũ Ngọc Út¹ và Nguyễn Thanh Phương²

¹Bộ môn Thủy sinh học ứng dụng, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Bộ môn Hải sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Phạm Thị Tuyết Ngân (email: pttngan@ctu.edu.vn)

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the influence of salinity on the growth of *Vibrio* spp. in vitro condition. Two hundred and forty-three *Vibrio* strains were isolated from 108 samples of sludge and water of My Thanh River, Soc Trang province. The isolates were characterized and identified by API 20E and 16S-rRNA sequences, resulting in three strains of *Vibrio cholerae*, three strains of *Vibrio parahaemolyticus*, and three strains of *Vibrio campbellii*. Growth of these strains was tested at different salinity (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 and 45‰). The bacterial density in the test was quantified by colonies counting on agar plates method. The results show that bacterial densities were lowest at salinity 5‰ in all strains, significantly different from the other treatments ($P < 0.05$). The suitable salinity for the development of these strains was ranged from 10‰ to 45‰. The optimal salinity for the growth of *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. campbellii* was 25-35‰, 30-40‰, and 15-45‰, respectively. This study showed that salinity affects the growth of *Vibrio* spp.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của độ mặn đến sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio* spp. trong điều kiện phòng thí nghiệm. Kết quả phân lập được 243 chủng *Vibrio* từ 108 mẫu bùn và nước trên tuyến sông Mỹ Thanh thuộc tỉnh Sóc Trăng. Các chủng vi khuẩn được tuyển chọn để định danh bằng bộ kit API 20E và giải trình tự 16S-rRNA, kết quả thu được 3 chủng *Vibrio cholerae*, 3 chủng *Vibrio parahaemolyticus* và 3 chủng *Vibrio campbellii*. Các chủng *Vibrio* này được nuôi cấy thử nghiệm sự sinh trưởng ở các độ mặn khác nhau (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45‰). Mật độ vi khuẩn sau khi nuôi cấy được định lượng bằng phương pháp đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch. Kết quả cho thấy tất cả các chủng *Vibrio* thử nghiệm đều kém phát triển đáng kể ở độ mặn 5‰ so với các độ mặn còn lại ($P < 0,05$). Tất cả các chủng *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* và *V. campbellii* đều thích hợp phát triển ở độ mặn cao từ 10‰ đến 45‰ và kém phát triển nhất ở 5‰. *V. cholerae* phát triển tốt nhất ở khoảng độ mặn từ 25 đến 35‰. Trong khi đó, *V. parahaemolyticus* thích hợp ở độ mặn từ 30 đến 40‰ và đối với *V. campbellii* là từ 15 đến 45‰. Điều này cho thấy độ mặn có ảnh hưởng đến sự phát triển của tất cả các chủng *Vibrio*.

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 30/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 21/12/2019

Ngày duyệt đăng: 29/04/2020

Title:

Effect of salinity on growth of *Vibrio* spp. in vitro conditions

Từ khóa:

Độ mặn, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*

Keywords:

Salinity, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio campbellii*

Trích dẫn: Phạm Thị Tuyết Ngân, Nguyễn Hoàng Nhật Uyên, Vũ Ngọc Út và Nguyễn Thanh Phương, 2020. Ảnh hưởng của độ mặn lên sự phát triển của vi khuẩn *Vibrio* spp. trong điều kiện phòng thí nghiệm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(2B): 127-135.

1 GIỚI THIỆU

Với điều kiện tự nhiên thuận lợi, Sóc Trăng có tiềm năng lợi thế trong phát triển kinh tế biển. Riêng đối với lĩnh vực nuôi trồng thủy sản, trong nhiều năm qua, nghề nuôi tôm nước lợ tiếp tục được khẳng định là một thế mạnh và trở thành ngành kinh tế mũi nhọn của Sóc Trăng cũng như nước ta với hai đối tượng nuôi chủ lực là tôm sú (*Penaeus monodon*) và tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Tuy nhiên, hiện nay tình hình dịch bệnh trên tôm đang diễn biến phức tạp và ảnh hưởng nghiêm trọng đến nghề nuôi tôm ở Sóc Trăng nói riêng và cả nước nói chung. Trong đó, bệnh do nhóm vi khuẩn *Vibrio* thường xảy ra phổ biến trong quá trình nuôi thủy sản. Đây là nhóm vi khuẩn luôn có mặt ở hầu hết các cơ quan, bộ phận của tôm kể cả tôm khỏe. Chúng xâm nhập vào trại sản xuất giống từ các nguồn như: nguồn nước cấp, dụng cụ sản xuất, sử dụng chế phẩm sinh học kém chất lượng. Theo nhiều nghiên cứu, độ mặn có ảnh hưởng đến mật độ cũng như các đặc tính sinh lý của *Vibrio*. Do đó, nghiên cứu này được thực hiện trong điều kiện phòng thí nghiệm nhằm đánh giá ảnh hưởng của độ mặn đến mật độ của một số loài *Vibrio* thường gặp ở tuyến sông Mỹ Thanh-Sóc Trăng. Từ đó cung cấp thông tin làm tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Mẫu nước và mẫu bùn được thu ở 3 điểm trên tuyến sông Mỹ Thanh: Nhu Gia-đầu nguồn, Mỹ Thanh 1-giữa nguồn và cửa sông Mỹ Thanh-cuối nguồn; mẫu nước được thu lúc nước lớn và mẫu bùn thu nước ròng. Mẫu được thu định kỳ mỗi tháng một lần trong suốt thời gian khảo sát từ 7/2017 đến 6/2018. Mẫu thu được trữ lạnh và chuyển về phòng thí nghiệm vi sinh vật hữu ích, thuộc bộ môn Thủy sinh học ứng dụng, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ để phân tích trong vòng vài giờ.

2.2 Phương pháp nghiên cứu

Phân lập *Vibrio* spp. từ nước và bùn: mẫu nước và bùn đáy được pha loãng bằng nước muối sinh lý NaCl 0,85% tiệt trùng đến nồng thích hợp và tảo đều trên đĩa petri có chứa các môi trường CHROMagar™ *Vibrio*, HiCrome *Vibrio* Agar, Nutrient agar và Thiosulphate Citrate Bile Sucrose Agar, ủ ở 28°C trong 24 giờ. Dựa vào hình dạng, màu sắc của khuẩn lạc trên từng loại môi trường để chọn ra giống *Vibrio*. Các loài *Vibrio* được phân biệt bằng đặc điểm hình thái các kiểu khuẩn lạc khác nhau thể hiện qua sự lên men đường sucrose. Trên môi trường Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose

(TCBS), *V. cholerae* lên men đường sucrose nên khuẩn lạc có màu vàng, ngược lại *V. parahaemolyticus* và *V. campbellii* không lên men sucrose nên khuẩn lạc có màu xanh lá cây (Austin, 1988; Đỗ Thị Hòa, 1999). Trên môi trường CHROMagar™ *Vibrio*, khuẩn lạc *V. parahaemolyticus* có màu tím hoa cà, *V. vulnificus* và *V. cholerae* có màu xanh biển đến xanh lam, *V. alginolyticus* không màu. Trong khi đó trên môi trường HiCrome *Vibrio* Agar, khuẩn lạc *V. cholerae* có màu tím và *V. parahaemolyticus* màu xanh lá nhạt (Hara-Kudo *et al.*, 2001). Các chủng *Vibrio* sau khi phân lập được tách rỗng nhiều lần để tạo dòng thuần và được nuôi tăng sinh trong môi trường NB (Nutrient Broth, HIMEDIA) (có bổ sung 1,5% NaCl) trong 24 giờ ở 28°C. Các chủng vi khuẩn này được trữ lạnh ở -80°C với glycerol để dùng trong các nghiên cứu tiếp theo (Huys, 2002).

Định danh *Vibrio* spp. bằng kit sinh hóa API 20E và giải trình tự gen 16S-rRNA

Các chủng *Vibrio* thuần được chọn để định danh bằng bộ kit API 20E (BioMerieux, Pháp). Phương pháp thực hiện: cho một ít nước vào khay nhựa của bộ kit để giữ ẩm. Dùng que cấy tiệt trùng lấy một ít khuẩn lạc cho vào 5 mL nước muối sinh lý tiệt trùng, lắc đều để đạt độ đục tương đương ống chuẩn McFarland 0,5 (tương đương mật độ 10⁸ CFU/mL). Dùng pipet hút dung dịch vi khuẩn này cho vào mỗi ô của bộ kit. Nhỏ dung dịch vi khuẩn vào đầy các ô (trừ 3 ô CIT, VP, GEL), 5 ô ADH, LDC, ODC, H₂S và URE cho thêm parafin đã tiệt trùng để tạo điều kiện yếm khí. Đậy nắp khay lại và ủ trong tủ ẩm ở 28°C trong vòng 24 giờ rồi đọc kết quả theo hướng dẫn nhà sản xuất.

Ba chủng *Vibrio* sau khi được định danh bằng kit API 20E tiếp tục được định danh lần nữa bằng phương pháp giải trình tự gen 16S-rRNA tại công ty Nam Khoa với các bước sau: (1) chọn mẫu cấy thuần, (2) ly trích DNA bằng phương pháp sốc nhiệt, (3) đo nồng độ DNA (25- 500 ng/phản ứng) bằng máy Biophotometer, (4) lấy 5µl mẫu cho vào phản ứng PCR để khuếch đại đặc hiệu đoạn DNA dài 500 bp trên vùng gen 16S-rRNA bằng hệ thống máy PCR Thermal Cycler của Bio-Rad, (5) điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 2%, chụp hình bằng hệ thống máy Gel Doc của Bio-Rad, (6) tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ QIA quick PCR Purification Kit của QIAGEN, (7) PCR SEQ sản phẩm đã tinh trước khi giải trình tự trên hệ thống máy ABI 3130XL, (8) phân tích kết quả bằng phần mềm sequencing analysis 5.3, và so với kết quả trên ngân hàng Gen NCBI.

Phương pháp pha loãng và đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch (Harwood and Archibald, 1990)

Thao tác được thực hiện trong tủ cấy vô trùng. Chuyển 1 mL mẫu huyền dịch vi khuẩn vào ống nghiệm chứa 9 mL nước muối sinh lý (0,85%) tiệt trùng, thu được độ pha loãng là 10^1 , lắc đều bằng máy vortex, tiếp tục cho 1 mL nước ở ống nghiệm có độ pha loãng 10^1 vào ống nghiệm có chứa 9 mL nước muối sinh lý, thu được độ pha loãng 10^2 . Thực hiện lặp lại thao tác trên cho đến khi được độ pha loãng thích hợp, mỗi độ pha loãng lặp lại 3 lần. Lấy 0,1 mL mẫu sau khi được pha loãng nhỏ vào đĩa petri có chứa môi trường thạch được chuẩn bị sẵn. Sau đó dùng que tán trải đều mẫu trên môi trường thạch đến khi khô hoàn toàn. Sau đó đĩa được ủ ở 28°C trong 24 - 48 giờ. Sau khi ủ, đếm số khuẩn lạc phát triển trên bề mặt thạch của các đĩa môi trường để xác định mật độ vi khuẩn có trong mẫu. Các đĩa môi trường của cả 3 độ pha loãng được chọn cần có số khuẩn lạc dao động trong khoảng từ 30 đến 300 khuẩn lạc để đảm bảo độ tin cậy của phương pháp.

Mật độ vi sinh vật được tính bằng đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU/mL). Tính số khuẩn lạc trung bình ở từng độ pha loãng. Mật độ vi khuẩn được tính bằng công thức: Mật độ vi khuẩn (CFU/mL) = số khuẩn lạc trung bình \times độ pha loãng $\times 10$

Thử nghiệm ảnh hưởng độ mặn lên sự sinh trưởng của *Vibrio* spp.

Từ kết quả định danh bằng bộ kit API 20E và giải trình tự gen, 9 chủng *Vibrio* (3 chủng *V. parahaemolyticus*: NU1, NG2.7, MT2.1; 3 chủng *V. campbellii*: VC30, MT2.3, MT3.7; và 3 chủng *V. cholerae*: NG1.4, NG2.4, MT2.4) được tuyển chọn để thử nghiệm sự ảnh hưởng của độ mặn lên sinh trưởng của *Vibrio* spp. Mỗi chủng *Vibrio* được nuôi tăng sinh trong môi trường NB để đạt mật độ 10^8 CFU/mL sau 24 giờ nuôi cấy (28°C). Lần lượt 1 mL mỗi chủng *Vibrio* được bố trí vào các chai thủy tinh chứa 500 mL môi trường NB đã tiệt trùng và bổ sung

NaCl để đạt các mức độ mặn: 5‰, 10‰, 15‰, 20‰, 25‰, 30‰, 35‰, 40‰ và 45‰. Hệ thống nuôi cấy được đặt trên máy lắc ở vận tốc 250 vòng/l phút trong vòng 24 giờ và ủ ở 28°C , mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Mật độ vi khuẩn được phân tích bằng cách đo mật độ quang (610 nm), xây dựng đường chuẩn (Bruno *et al.*, 2005) và phương pháp pha loãng và đếm khuẩn lạc trên đĩa thạch TCBS.

2.3 Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu được tổng hợp bằng phần mềm Excel và xử lý khác biệt thống kê bằng ANOVA một nhân tố ($P < 0,05$) nhằm tìm ra mối tương quan giữa yếu tố độ mặn và khả năng phát triển của *Vibrio* spp.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Phân lập, định danh vi khuẩn bằng kit API 20E và giải trình tự gen 16S-rRNA

Kết quả thu được 108 mẫu nước và bùn trên tuyến sông Mỹ Thanh, từ đó phân lập được 243 chủng *Vibrio* tạo khuẩn lạc xanh lá và vàng trên môi trường TCBS, xanh lam trên HiCrome *Vibrio* Agar và màu tím trên CHROMagar™ *Vibrio*. Ba mươi chủng *Vibrio* được chọn để định danh bằng kit API 20E. Kết quả cho thấy có 14 chủng thuộc loài *V. cholerae* (46,67%), 12 chủng *V. parahaemolyticus* (40%) và 3 chủng *V. campbellii* (10%) có những đặc tính chung của giống *Vibrio* là Gram âm, hình que ngắn, có thể di chuyển trong môi trường lỏng, cho phản ứng catalase và oxidase dương tính, có khả năng lên men glucose trong điều kiện hiếu khí và yếm khí, mọc trên môi trường TCBS (Buller, 2004) (Bảng 1, Hình 1). Kết quả định danh 3 chủng bằng phương pháp giải trình tự gen cũng cho thấy chủng MT2.4 thuộc loài *V. cholerae*, NG2.7 thuộc loài *V. parahaemolyticus* và MT3.7 là *V. campbellii* với mức độ tương đồng lần lượt là 100%, 99,99% và 99,99% khi so sánh tương đồng di truyền với các loài trên ngân hàng gen NCBI bằng công cụ BLAST, kết quả này trùng khớp với kết quả định danh bằng kit API 20E (Hình 2).

Bảng 1: Đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của 9 chủng *Vibrio* spp. được định danh bằng API 20E

Đặc điểm	<i>V. cholerae</i>			<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. campbellii</i>		
	NG1.4	NG2.4	MT2.4	NU1	NG2.7	MT2.1	VC30	MT2.3	MT3.7
Gram	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hình Dạng	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn	Que ngắn
Di động	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidaza	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ONPG	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ADH	+	-	+	-	+	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	+	+	-	+	+	-	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	+	+
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	-	-	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	+	+	+	-	+	+
GEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	+	+	-	+	+	+	+
SOR	+	+	+	-	-	-	+	+	+
RHA	-	-	-	+	-	-	-	-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	-	-	-	-	-	-	-	+	-
AMY	-	+	+	+	+	+	+	-	-
ARA	+	-	-	+	+	+	+	+/-	+/-



Hình 1: Kết quả test sinh hóa của chủng *V. cholerae* (A), *V. parahaemolyticus* (B) và *V. campbellii* (C) bằng kit API 20E



Hình 2: Kết quả giải trình tự 16S-rRNA

3.2 Ảnh hưởng của độ mặn lên sự phát triển của Vibrio spp.

3.2.1 Ảnh hưởng của độ mặn lên sự phát triển của V. Cholerae

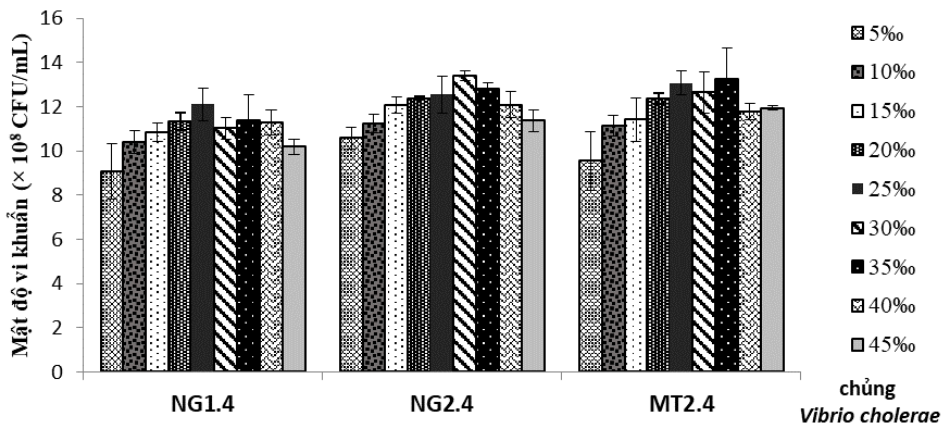
Kết quả cho thấy cả 3 chủng *V. cholerae* đều có xu hướng phát triển tăng khi độ mặn tăng trên mức 10‰. Ở độ mặn thấp 5‰, mật độ vi khuẩn thấp nhất và khác biệt thống kê so với các nghiệm thức còn lại ($P < 0,05$), dao động trong khoảng $9,08 \pm 1,27$ đến $10,58 \pm 0,49 \times 10^8$ CFU/mL. Trong khi đó ít có sự khác biệt thống kê giữa các độ mặn 10, 15, 20, 40 và 45‰ ($P < 0,05$). Nhìn chung, 3 chủng *V. cholerae* thí nghiệm phát triển tốt nhất ở khoảng độ mặn từ 25 đến 35‰. Kết quả này tương tự nghiên cứu của Singleton *et al.* (1982), *V. cholerae* tồn tại thích hợp ở vùng của sông nơi có độ mặn thích hợp là 25‰ (ở 10°C). Tác giả cũng nhận định rằng ion Na^+ đóng vai trò thiết yếu cho sự tăng trưởng của loài vi khuẩn

này. Ở một nghiên cứu khác (Huq, 1984) với 3 mức độ mặn 5, 10 và 15‰, *V. cholerae* tăng trưởng tốt nhất ở nồng độ 15‰. Bên cạnh đó, khi nghiên cứu về ảnh hưởng kết hợp giữa 3 mức nhiệt độ (6, 18 và 30°C) và độ mặn (8, 16 và 32‰) lên sự tồn tại của *V. cholerae* trong nước dằn tàu biển, kết quả cho thấy *V. cholerae* có khả năng tồn tại lâu nhất (240 ngày) ở nhiệt độ 18 °C trong điều kiện độ mặn cao nhất là 32‰. Tác giả cũng chỉ ra rằng khả năng tồn tại ngắn hạn của *V. cholerae* trong nước biển phụ thuộc vào nhiệt độ trong khi đó khả năng tồn tại lâu dài lại phụ thuộc vào độ mặn (McCarthy, 1996). Những kết quả nghiên cứu trên cho thấy *V. cholerae* thích hợp phát triển ở mức độ mặn cao nhất định nhưng không quá 35‰. Tương tự, Koch and Carter (1987) cũng nhận thấy *V. cholerae* chiếm tỷ lệ khá cao ở mức 106-107 CFU/mL và phát triển tốt ở độ mặn 15-25‰ trong môi trường tự nhiên.

Bảng 2: Ảnh hưởng của độ mặn lên mật độ V. cholerae

Độ mặn	Mật độ <i>V. cholerae</i> ($\times 10^8$ CFU/mL)		
	NG1.4	NG2.4	MT2.4
5‰	9,08 ± 1,27 ^a	10,58±0,49 ^a	9,54±1,35 ^a
10‰	10,40 ±0,50 ^{bc}	11,22±0,42 ^{ab}	11,14±0,47 ^b
15‰	10,85 ±0,43 ^{bc}	12,07±0,37 ^{bc}	11,42±0,98 ^b
20‰	11,35 ±0,40 ^{bcd}	12,39±0,07 ^c	12,37±0,26 ^{bc}
25‰	12,11 ±0,74 ^d	12,55±0,84 ^{cd}	13,08±0,54 ^c
30‰	11,03 ±0,50 ^{bcd}	13,40±0,24 ^d	12,65±0,94 ^{bc}
35‰	11,40 ±0,12 ^{cd}	12,79±0,30 ^{cd}	13,27±1,40 ^c
40‰	11,28 ±0,57 ^{bcd}	12,09±0,60 ^{bc}	11,77±0,38 ^{bc}
45‰	10,18 ±0,36 ^b	11,38±0,49 ^{ab}	11,93±0,10 ^{bc}

Các giá trị (trung bình ± độ lệch chuẩn) trong cùng một cột, có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.



Hình 3: Ảnh hưởng của độ mặn lên mật độ *V. cholerae*

3.2.2 Ảnh hưởng của độ mặn lên mật độ *V. Parahaemolyticus*

Tương tự, mật độ các chủng *V. parahaemolyticus* có xu hướng tăng dần khi độ mặn tăng dần đến 40‰ nhưng tăng trưởng giảm lại ở 45‰. Esteves *et al.* (2015) cũng nhận định rằng *V. parahaemolyticus* là loài ưa mặn và sự tăng trưởng có liên quan mật thiết với nhiệt độ và độ mặn của

môi trường. Ở nghiên cứu này với mức độ mặn 5‰, sự tăng trưởng của cả 3 chủng đều thấp nhất, mật độ từ $3,77 \pm 0,6$ đến $6,25 \pm 0,18 \times 10^8$ CFU/mL, có sự khác biệt rõ ràng với các độ mặn còn lại ($P < 0,05$), kết quả này tương tự nghiên cứu của Huang and Wong (2012), *V. parahaemolyticus* không thích hợp phát triển ở độ mặn thấp và khả năng chịu được độ mặn thấp ở mức 0,25‰.

Bảng 3: Ảnh hưởng của độ mặn lên mật độ *V. parahaemolyticus*

Độ mặn	Mật độ <i>V. parahaemolyticus</i> ($\times 10^8$ CFU/mL)		
	NU1	NG2.7	MT2.1
5‰	$3,77 \pm 0,62^a$	$5,05 \pm 0,39^a$	$6,25 \pm 0,18^a$
10‰	$5,48 \pm 0,25^b$	$5,93 \pm 0,17^b$	$6,77 \pm 0,32^b$
15‰	$5,75 \pm 0,40^{bc}$	$6,27 \pm 0,55^{bc}$	$7,09 \pm 0,33^{bcd}$
20‰	$5,36 \pm 0,57^b$	$6,79 \pm 0,24^{cde}$	$6,81 \pm 0,35^b$
25‰	$5,51 \pm 0,14^b$	$6,47 \pm 0,49^{bcd}$	$7,28 \pm 0,34^{cde}$
30‰	$6,59 \pm 0,40^{de}$	$7,15 \pm 0,16^e$	$7,59 \pm 0,05^{ef}$
35‰	$6,36 \pm 0,22^{cde}$	$7,13 \pm 0,09^e$	$7,81 \pm 0,13^f$
40‰	$6,78 \pm 0,43^e$	$7,30 \pm 0,19^e$	$7,47 \pm 0,11^{de}$
45‰	$6,00 \pm 0,22^{bcd}$	$6,93 \pm 0,07^{de}$	$6,93 \pm 0,07^{bc}$

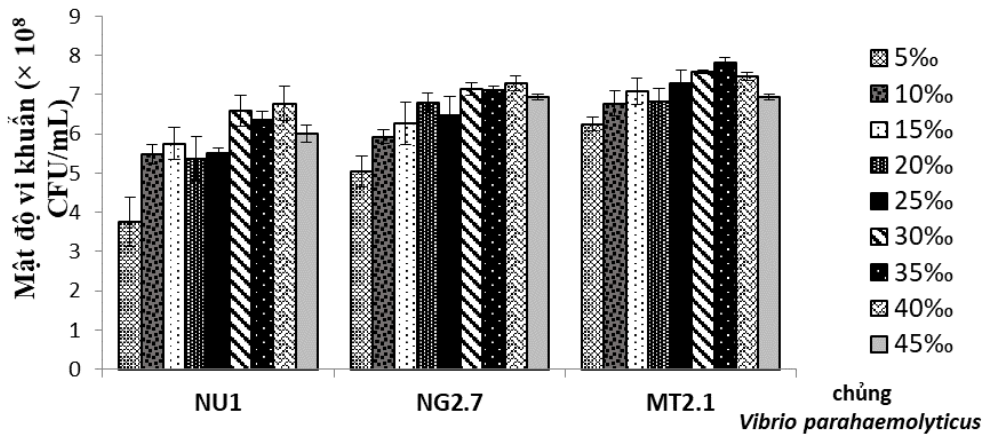
Các giá trị (trung bình \pm độ lệch chuẩn) trong cùng một cột, có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.

Bên cạnh đó, kết quả còn cho thấy *V. parahaemolyticus* phát triển thích hợp nhất ở độ mặn từ 30 đến 40‰ và không có sự khác biệt thống kê giữa các độ mặn này ($P < 0,05$), ngoại trừ ở chủng MT2.1, mật độ vi khuẩn phát triển cao nhất ($7,81 \pm 0,13 \times 10^8$ CFU/mL) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với tất cả các nghiệm thức còn lại. Mặc dù *Vibrio* spp. thích hợp phát triển khi ở độ mặn cao nhưng với độ mặn từ 45‰ trở lên thì tăng trưởng lại giảm xuống đáng kể ($P < 0,05$). Trong khi đó, không có sự khác biệt thống kê giữa độ mặn từ 10 đến

25‰. Tương tự thí nghiệm này, Trương Thị Mỹ Hạnh và *ctv.* (2017) đã nghiên cứu về sự phát triển của vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ở các độ mặn khác nhau 3, 15, 25, 35, 40‰ trong phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy loài vi khuẩn này phát triển mạnh nhất ở 25‰, thứ 2 là 15‰, thứ 3 là 35‰ và phát triển kém nhất ở 3‰. Sự khác nhau giữa kết quả nghiên cứu này và của tác giả Trương Thị Mỹ Hạnh và *ctv.* (2017) có thể giải thích do sự khác biệt giữa các chủng *V. parahaemolyticus* sử dụng trong thí nghiệm nhưng nhìn chung *Vibrio* spp. phát triển

tốt ở 20 - 25‰ và phát triển kém nhất ở 3-5‰. Wong *et al.* (2000) cũng có nghiên cứu về hệ sinh thái nước mặn từ 5-30‰ ở vùng cửa sông trong đó có các ao nuôi thủy sản, đặc biệt là ở các vùng nước ấm ven biển khu vực Đông Nam Á. Tác giả nhận thấy *V. parahaemolyticus* thích hợp phát triển ở độ mặn từ 15‰-30‰. Độ mặn 30‰ được Liu *et al.* (2016) nhận định là độ mặn tối ưu cho sự phát triển *V. parahaemolyticus* khi nhiệt độ ở mức 10°C. Trong một nghiên cứu khác về ảnh hưởng của 2 mức độ

mặn $13 \pm 2‰$ và $27 \pm 2‰$ đến thành phần loài và số lượng vi khuẩn *Vibrio* spp. trong nước và cơ thể tôm thẻ chân trắng của Nguyễn Duy Quỳnh Trâm và *ctv.*, 2017, mật độ *Vibrio* spp. tăng dần theo thời gian nuôi và ở môi trường có độ mặn cao có mật độ vi khuẩn trong môi trường nước và trên cơ thể tôm cao hơn ở môi trường có độ mặn thấp ($P < 0,05$). Từ đó, tác giả khuyến cáo nuôi tôm thẻ chân trắng ở độ mặn thấp có thể hạn chế sự gây bệnh của vi khuẩn *Vibrio* spp.



Hình 4: Ảnh hưởng của độ mặn lên mật độ *V. parahaemolyticus*

3.2.3 Ảnh hưởng của độ mặn lên mật độ *V. Campbellii*

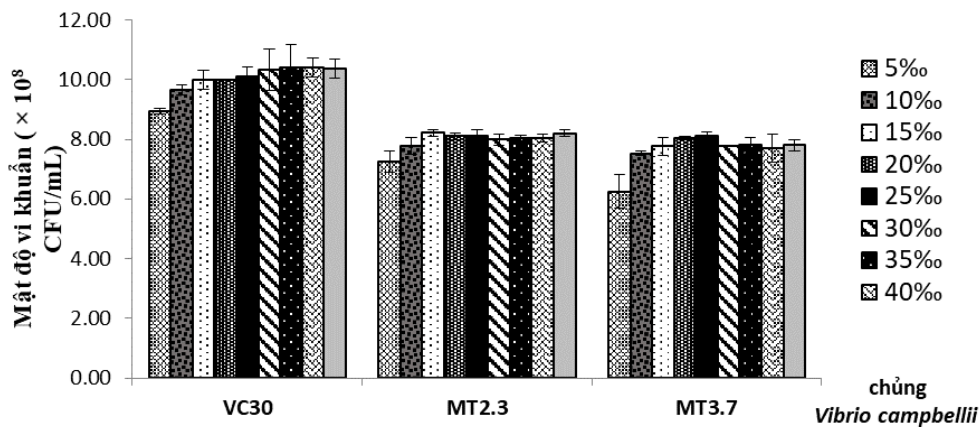
Hình 5 cho thấy mật độ của tất cả các chủng *V. campbellii* tăng dần theo độ mặn, mật độ vi khuẩn thấp nhất ở 5‰ (khác biệt thống kê so với các độ mặn còn lại, $P < 0,05$) và cao nhất ở 45‰. Nhìn chung, độ mặn thích hợp cho sự phát triển của *V. campbellii* từ 15 đến 45‰, kém phát triển hơn ở 10‰ và phát triển kém nhất ở 5‰. Chủng VC30 có mật độ phát triển cao hơn đáng kể so với 2 chủng còn lại, mật độ cao nhất đạt $10,42 \pm 0,07 \times 10^8$ CFU/mL ở 35‰, mật độ thấp nhất $8,93 \pm 0,09 \times 10^8$ CFU/mL ở 5‰. Trong khi đó, hai chủng MT2.3 và MT3.7 có mật độ tương đương nhau, trong khoảng từ $6,25 \pm 0,57 \times 10^8$ CFU/mL đến $8,13 \pm 0,11 \times 10^8$ CFU/mL. Kết quả này được củng cố bởi kết quả

nghiên cứu của Ramesh *et al.* (2014), khả năng phát triển và phát quang của chủng *V. campbellii* STF1 được khảo sát ở các nồng độ muối NaCl từ 0 đến 120‰, nghiên cứu này cho thấy rằng độ mặn đóng vai trò thiết yếu cho sự phát triển của *V. campbellii*. Ở độ mặn bằng 0‰, loài vi khuẩn này không thể phát triển được (tương tự kết quả nghiên cứu hiện tại với độ mặn 5‰, vi khuẩn phát triển rất kém), đây là loài vi khuẩn thích nghi ở độ mặn cao và có khả năng chịu mặn tới 110‰. Tuy nhiên, vi khuẩn cũng không thể phát triển ở ngưỡng độ mặn cao quá 120‰. Độ mặn tối ưu cho sự phát triển và phát quang của vi khuẩn được ghi nhận ở mức 30‰ và 60‰. Do đó, ở độ mặn cao nhất ở nghiên cứu này là 45‰ vẫn nằm trong ngưỡng tối ưu cho sự phát triển của *V. campbellii*.

Bảng 4: Ảnh hưởng của độ mặn lên mật độ *V. campbellii*

Độ mặn	Mật độ <i>V. campbellii</i> ($\times 10^8$ CFU/mL)		
	VC30	MT2.3	MT3.7
5‰	8,93 \pm 0,09 ^a	7,26 \pm 0,35 ^a	6,25 \pm 0,57 ^a
10‰	9,65 \pm 0,18 ^b	7,78 \pm 0,29 ^b	7,52 \pm 0,08 ^b
15‰	9,99 \pm 0,32 ^{cde}	8,21 \pm 0,13 ^c	7,76 \pm 0,30 ^{bc}
20‰	9,99 \pm 0,03 ^{bcd}	8,10 \pm 0,11 ^{bc}	8,04 \pm 0,08 ^{bc}
25‰	10,10 \pm 0,03 ^{cde}	8,13 \pm 0,19 ^{bc}	8,13 \pm 0,11 ^c
30‰	10,34 \pm 0,07 ^{cde}	7,99 \pm 0,18 ^{bc}	7,78 \pm 0,03 ^{bc}
35‰	10,42 \pm 0,07 ^e	8,03 \pm 0,09 ^{bc}	7,80 \pm 0,24 ^{bc}
40‰	10,41 \pm 0,32 ^e	8,04 \pm 0,12 ^{bc}	7,71 \pm 0,46 ^{bc}
45‰	10,36 \pm 0,33 ^{cde}	8,20 \pm 0,11 ^c	7,80 \pm 0,19 ^{bc}

Các giá trị (trung bình \pm độ lệch chuẩn) trong cùng một cột, có chữ cái theo sau giống nhau thì không khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P < 0,05$.



Hình 5: Ảnh hưởng của độ mặn lên mật độ *V. campbellii*

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

4.1 Kết luận

Các loài *Vibrio* có sự phân bố cao ở khu vực sông Mỹ Thanh – Sóc Trăng. Trong đó, chủ yếu là loài *V. cholerae* (46,67%), 12 chủng *V. parahaemolyticus* (40%) và 3 chủng *V. campbellii* (10%) trong số mẫu thu thập được. Cả 3 loài *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* và *V. campbellii* đều thích hợp phát triển ở độ mặn cao từ 10‰ đến 45‰ và kém phát triển nhất ở 5‰. *V. cholerae* phát triển tốt nhất ở khoảng độ mặn từ 25 đến 35‰. *V. parahaemolyticus* phát triển thích hợp nhất ở độ mặn từ 30 đến 40‰. *V. campbellii* phát triển thích hợp nhất ở độ mặn từ 15 đến 45‰.

4.2 Đề xuất

Dựa vào kết quả phân bố cũng như đặc tính thích nghi với độ mặn cao của các loài *Vibrio* đã khảo sát có thể khuyến cáo các hộ nuôi tôm không chế độ mặn trong ao nuôi để hạn chế dịch bệnh xảy ra. Bên cạnh đó, nên có thêm các nghiên cứu về ảnh hưởng

của độ mặn lên sự sinh trưởng của các loài *Vibrio* khác cũng gây bệnh trên thủy sản nhằm cung cấp đầy đủ thông tin dịch tễ giúp việc phòng ngừa dịch bệnh hiệu quả hơn.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài này được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản. Chúng tôi xin chân thành cảm ơn tất cả thầy cô, cán bộ và các em sinh viên thực hiện đề tài tại Bộ môn thủy sinh vật ứng dụng, Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Austin, B. (Ed.), 1988. Methods in aquatic bacteriology. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, West Sussex, 452p. ISBN0-47191651X.
 Bruno, J. F., Boyer, K. E., Duffy, J. E., Lee, S. C. and Kertesz, J. S., 2005. Effects of macroalgal species identity and richness on primary production in benthic marine communities. Ecology Letters, 8(11): 1165-1174.

- Buller, B. N., 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual/Nicky B. Buller. ISBN.0.85199-738-4.
- Esteves, K., Mosser, T., Aujoulat, F., Hervio-Heath, D., Monfort, P., and Jumas-Bilak, E., 2015. Highly diverse recombining populations of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in French Mediterranean coastal lagoons. *Frontier in Microbiology*, 6: 708.
- FAO, 2013. Report of the FAO/MARD Technical workshop on early mortality syndrome (EMS) or acute hepatopancreatic necrosis syndrome (AHPND) of cultured shrimp (under TCP/VIE/3304). FAO Fisheries and Aquaculture Report, Ha Noi, Viet Nam, 54, 1053.
- Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J., Kumagai, S., 2001. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in Seafood. *Applied Environmental Microbiology*. 67(12): 5819-5823.
- Harwood, C. R., and Archibald, A. R., 1990. Growth, maintenance and general techniques. In C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom, 1-26.
- Huang, W.S. and Wong, H.C., 2012. Characterization of low salinity stress in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of food protection*. 75(2): 231-237.
- Huq, A., West P.A., Small E.B. and Huq, M.I., 1984. Influence of Water Temperature, Salinity, and pH on Survival and Growth of Toxigenic *Vibrio cholerae* Serovar O1 Associated With Live Copepods in Laboratory Microcosms. *Applied and Environmental Microbiology*. 48(2):420-424.
- Huys, G., 2002. Preservation of bacteria using commercial cry preservation Systems. *Standard Operation Procedure*, Asia resist.
- Koch, R., and Carter, K. C., 1987. Critical discussions of publications challenging the significance of tuberculosis bacilli. In: *Contributions in medical studies. Essays of Robert Koch*. Connecticut: Greenwood Press, 117-127.
- Liu, B., Liu, H., Pan, Y., Xie, J. and Zhao, Y., 2016. Comparison of the Effects of Environmental Parameters on the Growth Variability of *Vibrio parahaemolyticus* Coupled with Strain Sources and Genotypes Analyses. *Frontiers in Microbiology*, 44(5): 1047-1058.
- McCarthy, S.A, 1996. Effects of temperature and salinity on survival of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 in seawater. *Microbial Ecology*, 31(2): 167-175.
- Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Nguyễn Ngọc Phước và Dương Văn Chinh, 2017. Ảnh hưởng của độ mặn đến thành phần và số lượng vi khuẩn *Vibrio* spp. trong môi trường nước và trên cơ thể tôm thẻ chân trắng nuôi thương phẩm ở Quảng Trị. *Tạp chí Khoa học-Đại học Huế*, 126 (3C): 155-162.
- Singleton, F.L., Attwell, R., Jangi, S. and Colwell, R.R., 1982. Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Applied Environmental Microbiology*, 44(5):1047-1058.
- Wong, T.H.F., P.F Breen. and Brizga, S., 2000. Hydrological, geomorphological and ecological effects of catchment urbanisation, report in preparation. Cooperative Research Centre for Catchment Hydrology.
- Wu, Y., Wen, J., Ma, Y., Ma, X., and Chen, Y., 2014. Epidemiology of foodborne disease outbreaks caused by *Vibrio parahaemolyticus*, China, 2003–2008. *ScienceDirect, Food Control*, 46:197-202.