

# NGHIÊN CỨU ĐỘC LỰC CỦA VI KHUẨN *Aeromonas* sp. TRÊN CÁ RÔ PHI VẦN (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) VÀ TÁC DỤNG CỦA VACCIN BẤT HOẠT TRONG PHÒNG TRỊ BỆNH

RESEARCH ON TOXIN OF *Aeromonas* sp. IN TILAPIA (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) AND EFFECT OF INACTIVATION VACCINES IN DISEASE PREVENTION AND TREATMENT

Phạm Thị Hải Yến\*, Đỗ Minh Nhật, Huỳnh Văn Vĩ, Trần Quang Khánh Vân

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm Huế, 102 Phùng Hưng, Huế

Email: phamhaiyen9408@gmail.com

## ABSTRACT

Through culture process, isolation and biochemical test, we have identified the pathogenic agent bleeding of *Tilapia niloticus* are two species of bacteria *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae*. Results determine LD<sub>50</sub> doses can cause death 50% of the experimental fish of bacteria *A. hydrophila* is 10<sup>5.3</sup> cell/ml and lethal concentration 50% of experimental fish of bacteria *A. caviae* is 10<sup>5.5</sup> cell/ml. Thus, the pathogenicity of *A. caviae* is higher than *A. hydrophila*. Vaccines have inactivation a bacterial concentration of 10<sup>5</sup> cells/ml is capable for forming the protection for fish. Protection rate of the vaccine for *A. caviae* (83,3%) is higher than *A. hydrophila* (66,7%). Therefore, the current trend of the world in general and Vietnam in particular replace the use of antibiotics by vaccines for disease prevention and treatment for pets to ensure product quality and environment.

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus*) là đối tượng được người dân yêu thích và thả nuôi nhiều do tốc độ tăng trọng nhanh, phổ thức ăn rộng, sức chịu đựng cao với các điều kiện bất lợi của môi trường, có khả năng tận dụng nhiều loại thức ăn sẵn có của địa phương và dễ nuôi ở các mô hình khác nhau. Bên cạnh đó chất lượng thịt thơm ngon nên rất được người tiêu dùng trong nước và trên thế giới ưa chuộng. Tuy nhiên, trong những năm gần đây, việc nuôi thâm canh đã làm dịch bệnh ở trên đối tượng này xảy ra ngày càng nghiêm trọng hơn. Đặc biệt, bệnh do vi khuẩn *Aeromonas* sp. là nguyên nhân gây nên thiệt hại lớn và đã làm ảnh hưởng đến hiệu quả kinh tế của ngành nuôi trồng thủy sản. Chính vì vậy việc nghiên cứu, phát triển các phương pháp phòng trị bệnh sử dụng thảo dược và sản xuất vaccin cho cá nước ngọt nói chung và cá rô phi nói riêng rất cần thiết nhằm đảm bảo cho sự phát triển bền vững của nghề nuôi trồng thủy sản. Hiện nay, ở Việt Nam việc nghiên cứu vaccin dành cho cá chỉ mới được thực hiện ở một số đề tài, điển hình là đề tài nghiên cứu vaccin phòng bệnh gan thận mũ ở cá tra. Xuất phát từ yêu cầu thực tiễn đó, chúng tôi tiến hành đề tài: “**Nghiên cứu độc lực của vi khuẩn *Aeromonas* sp. trên cá rô phi vằn (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758) và tác dụng của vaccin bất hoạt trong phòng trị bệnh**”

## NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### Nội dung nghiên cứu

- Xác định loài vi khuẩn gây bệnh trên cá rô phi vằn
- Xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *Aeromonas* sp trên cá rô phi vằn.
- Xác định tỉ lệ bảo hộ của vaccin bất hoạt.

### Phương pháp nghiên cứu

#### **Phương pháp nuôi cấy, phân lập vi khuẩn**

Phương pháp phân lập xác định tên loài vi khuẩn gây bệnh dựa trên phương pháp nghiên cứu của Bergey (1957) và Nguyễn Lâm Dũng (2006).

#### **Phương pháp nuôi cấy**

Lấy mẫu gan và thận của cá nghiên cứu, sau đó hòa trong nước muối sinh lý theo tỉ lệ: 1g nội tạng + 10 ml nước muối sinh lý. Dung dịch thu được đem lọc qua giấy lọc để loại bỏ cặn bẩn.

Sau đó cấy lên môi trường môi trường NA, giữ các đĩa cấy ở nhiệt độ phòng. Sau 24h - 48h, chọn khuẩn lạc rời, đặc trưng cây chuyển sang môi trường BHIA.

### **Phương pháp định danh vi khuẩn**

Phương pháp nhuộm vi khuẩn được tiến hành theo phương pháp của Christian Gram (1884)

Thử các phản ứng sinh hoá với các hoá chất.

### **Phương pháp nuôi thuần cá**

Cá dùng cho thí nghiệm được thu tại Trung tâm sản xuất giống cá nước ngọt cấp I, Cư Chánh - Thừa Thiên Huế, trọng lượng 200 con/kg. Tiến hành thu 2 đợt, mỗi đợt 200 con. Cá được lọc qua lưới để có kích thước bằng nhau, chú ý chọn những con khỏe mạnh, hoạt động nhanh nhẹn, màu sắc tươi sáng, không bị trầy xước hay sinh vật bám. Toàn bộ cá được nuôi thuần trong 1 bể composite có thể tích 4m<sup>3</sup>.

Cá được cho ăn 2 lần/ngày bằng thức ăn công nghiệp vào lúc 8h sáng và 16h chiều. Ngưng cho cá ăn 1 ngày trước khi tiến hành thí nghiệm.

Tiến hành xiphon định kỳ 1 ngày/lần. Thời gian nuôi thuần là 7 ngày. Trước khi tiến hành thí nghiệm, tiến hành thu cá trong bể, chọn những con có kích thước đồng đều, khỏe mạnh, màu sắc tươi sáng, không có sinh vật bám để bố trí thí nghiệm.

### **Phương pháp điều chế vacxin bất hoạt**

Vacxin được điều chế dựa trên phương pháp của Navetco (2006), bao gồm các bước sau:

- Vi khuẩn được thu từ mẫu bệnh phẩm đem nuôi cấy thuần và thử phản ứng sinh hóa để định danh chính xác tác nhân gây bệnh.

- Tiến hành pha nồng độ 10<sup>8</sup> tế bào/ml bằng máy đo mật độ tế bào.

- Pha loãng để có các nồng độ 10<sup>7</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup> tế bào/ml

- Bất hoạt bằng formalin 36% với tỉ lệ 1%, đem ủ trong tủ âm, thời gian ủ 72h.

### **Phương pháp xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *Aeromonas* sp**

Phương pháp xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *Aeromonas* sp được thực hiện theo phương pháp của Reed & Muench (1938).

Cá thí nghiệm phải khỏe mạnh, màu sắc tươi sáng và không bị tổn thương bên ngoài, kích thước đồng đều.

Thí nghiệm gồm 6 lô với 3 lần lặp lại. Mỗi lô gồm 6 cá rô phi có trọng lượng 5 gam/con được bố trí trong thùng xốp có thể tích 40 lít.

Cá ở các lô thí nghiệm được cảm nhiễm với các nồng độ vi khuẩn khác nhau từ 10<sup>1</sup>-10<sup>6</sup> tế bào/ml bằng phương pháp tiêm vào xoang bụng với liều lượng 0,1 ml/con. Cá ở lô đối chứng âm được tiêm bằng nước muối sinh lí với liều 0,1 ml/con, cá ở lô đối chứng dương không tiêm gì.

Quan sát cá sau khi tiêm, nếu có biểu hiện bất thường như bơi không định hướng, bỏ ăn, chết. Chứng tỏ cá bị ảnh hưởng do tác động cơ học. Tiến hành vớt bỏ những con này và bổ sung cá nhằm đảm bảo số lượng cá ở mỗi lô là 6 con.

Thực hiện chế độ sục khí liên tục, không thay nước, cho ăn trong thời gian thí nghiệm và hằng ngày tiến hành ghi nhận số cá chết.

Thống kê số cá chết và số cá còn sống trong mỗi lô để tính giá trị LD<sub>50</sub> theo công thức sau:

$$LD_{50} = 10^{(a+x)}$$

Trong đó :

10<sup>a</sup>: Nồng độ tại đó số lượng cá sống và cá chết sau thí nghiệm là 50%

$$x = (Pa - 50)/(Pa - Pu)$$

Pa, Pu là tỉ lệ cận trên và cận dưới của nồng độ gây chết 50%

Lấy mẫu cá chết ở các lô đem nuôi cấy, phân lập, định danh vi khuẩn để xác định nguyên nhân gây chết.

### **Thí nghiệm xác định tỉ lệ bảo hộ của vacxin**

Phương pháp xác định tỉ lệ bảo hộ của vacxin được thực hiện theo phương pháp của Nguyễn Ngọc Phước (2009).

Vào ngày đầu tiên của thí nghiệm, cá ở các lô thí nghiệm được tiêm vacxin có nồng độ vi khuẩn bất hoạt khác nhau từ  $10^5$ - $10^8$  tế bào/ml bằng phương pháp tiêm vào xoang bụng với liều lượng 0,1 ml/con. Cá ở lô đối chứng âm được tiêm nước muối sinh lí với liều 0,1 ml/con, cá ở lô đối chứng dương không tiêm gì.

Cách lần tiêm thứ nhất 7 ngày, tiến hành tiêm nhắc lại vacxin bất hoạt với liều 0,1 ml/con. Cá ở lô đối chứng âm được tiêm 0,1 ml nước muối sinh lí/con, cá ở lô đối chứng dương không tiêm gì. Trước khi tiêm tiến hành kiểm tra vô trùng vacxin trên môi trường BHIA nhằm xác định vi khuẩn đã bị bất hoạt.

Cách lần tiêm thứ nhất 14 ngày, tiến hành công cường độc lực cho toàn bộ cá thí nghiệm với liều vi khuẩn là  $100LD_{50}$ , liều lượng 0,1 ml/con.

Quan sát cá sau khi tiêm, nếu có biểu hiện bất thường như bơi không định hướng, chết. Chứng tỏ cá bị ảnh hưởng do tác động cơ học. Tiến hành vớt bỏ những con này và tiêm bổ sung, đảm bảo số lượng cá ở mỗi lô là 6 con.

Theo dõi cá sau khi công cường độc lực trong 10 ngày.

Thực hiện chế độ sục khí liên tục, không thay nước và cho ăn trong thời gian thí nghiệm.

Hàng ngày tiến hành ghi nhận số cá chết.

Thông kê tỉ lệ cá chết để xác định tỉ lệ bảo hộ của mỗi loại vacxin theo công thức Amend (1970)

$$RPS = 1 - \frac{\text{tỉ lệ chết của nhóm gây miễn dịch}}{\text{tỉ lệ chết của nhóm đối chứng}} \times 100$$

## **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

### **Trọng lượng, chiều dài mẫu cá rô phi bị bệnh**

Trong quá trình nghiên cứu, mẫu cá rô phi vẫn được thu trong 6 đợt, mỗi đợt chúng tôi đều tiến hành cân trọng lượng và đo chiều dài mẫu bệnh phẩm, kết quả được thể hiện ở bảng 3.1.

**Bảng 3.1. Trọng lượng, chiều dài mẫu cá rô phi vẫn bị bệnh**

Trọng lượng (g/con) MD ± SD	Chiều dài (cm/con) MD ± SD
5,1 ± 1,05	4,1 ± 2,63

**Kết quả nuôi cấy, phân lập, quan sát đặc điểm hình thái cấu tạo, màu sắc khuẩn lạc của tác nhân gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi**

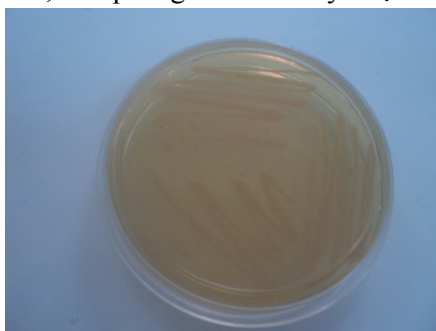
### **Kết quả quan sát dấu hiệu bệnh lý**

Mẫu cá bệnh thu được có trọng lượng trung bình từ 5g/con, với những dấu hiệu bệnh lý bên ngoài điển hình như: Cá bơi lơ đờ, mắt bị lồi đục hay bị tổn thương, trên cơ thể có hiện tượng vảy bị tróc, da bị xuất huyết tại các vị trí như thân, các gốc vây, hậu môn, bụng chướng to..., giải phẫu cá bệnh nhận thấy trong xoang bụng có tích dịch, thận và lá lách sưng to.

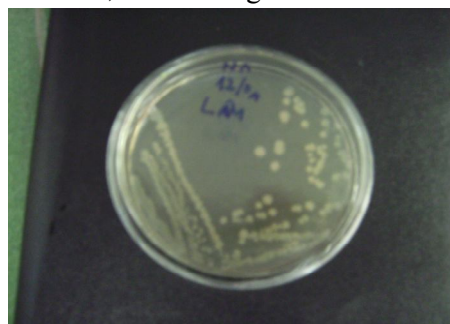
## Kết quả quan sát sự phát triển của khuẩn lạc trên các môi trường nuôi cấy

### Kết quả phát triển của khuẩn lạc trên môi trường NA

Sau 24h nuôi cấy, chúng tôi tiến hành quan sát những đặc điểm của khuẩn lạc mọc trên môi trường NA, kết quả nghiên cứu này được mô tả qua hình 3.1; 3.2 và bảng 3.2.



Hình 3.1. Khuẩn lạc loài 1



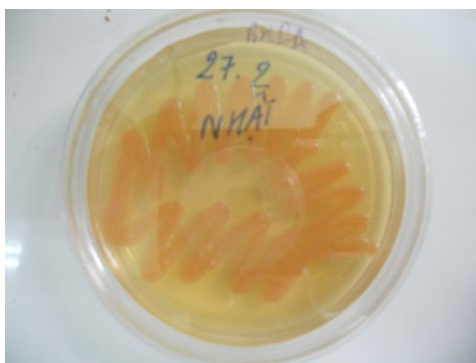
Hình 3.2. Khuẩn lạc loài 2

Bảng 3.2. Đặc điểm khuẩn lạc vi khuẩn trên môi trường NA

Đặc điểm sinh hóa	Loài 1	Loài 2
Màu sắc khuẩn lạc	Vàng sữa	Trắng sữa
Hình dạng khuẩn lạc	Trơn, bóng, đều	Trơn, bóng, đều
Mùi khuẩn lạc	Có mùi hôi	Không có mùi
Đường kính khuẩn lạc	1 - 2mm	1 - 3mm

### Kết quả phát triển của khuẩn lạc trên môi trường BHIA

Từ hai loại khuẩn lạc mọc trên môi trường NA, chúng tôi tiến hành chọn những khuẩn lạc đặc trưng để cấy chuyển sang môi trường BHIA. Sau 24h nuôi cấy, tiến hành quan sát đặc điểm của khuẩn lạc, kết quả được thể hiện ở hình 3.3; 3.4 và bảng 3.3.



Hình 3.3. Khuẩn lạc loài 1



Hình 3.4. Khuẩn lạc loài 2

Bảng 3.3. Đặc điểm khuẩn lạc trên môi trường BHIA

Đặc điểm sinh hóa	Loài 1	Loài 2
Màu sắc khuẩn lạc	Vàng đậm	Trắng sữa
Hình dạng khuẩn lạc	Trơn, bóng, đều	Trơn, bóng, đều
Mùi khuẩn lạc	Có mùi hôi	Không có mùi
Đường kính khuẩn lạc	2 - 4 mm	2 - 5 mm

### Kết quả nhuộm Gram

Từ 2 loại khuẩn lạc thu được, chúng tôi tiến hành nhuộm Gram để kiểm tra hình thái của chúng. Kết quả quan sát dưới kính hiển vi thấy các đám vi khuẩn bắt màu hồng, dạng hình que ngắn, hai đầu hơi tròn. Đây là vi khuẩn Gram âm, kích thước  $0,5 \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$ , có khả năng di động.



**Hình 3.5. Kết quả nhuộm Gram**

**Kết quả thử phản ứng sinh hóa**

Để đảm bảo độ chính xác chúng tôi tiến hành thử phản ứng sinh hóa hai lần trên từng loài vi khuẩn, kết quả thử phản ứng sinh hóa được thể hiện qua bảng 3.4

**Bảng 3.4. Đặc điểm sinh hóa của hai loài vi khuẩn phân lập**

<b>Đặc điểm sinh hóa</b>	<b>Loài 1</b>	<b>Loài 2</b>
Hình dạng tế bào	Hình que	Hình que
Hình dạng khuẩn lạc	Tròn, đều, bóng	Tròn, đều, bóng
Màu sắc khuẩn lạc	Vàng sữa, vàng đậm	Trắng, ngã sang vàng
Kích thước khuẩn lạc	1- 4 mm	2 - 5mm
<b>Phát triển trên môi trường</b>		
NA	+	+
BHIA	+	+
Bất màu Gram	-	-
Khả năng di động	+	+
Lên men Glucose	+	+
Lên men Mantose	+	+
Lên men Lactose	-	-
Lên men Saccharose	+	+
KIA	+	+
MR	-	-
VP	-	+
Citrate	-	+
Indol	+	+
Sinh hơi từ glucose	-	+
Sinh H <sub>2</sub> S	+	-
<b>Kết luận</b>	<i>Aeromonas caviae</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i>

Ghi chú: + Dương tính

- Âm tính

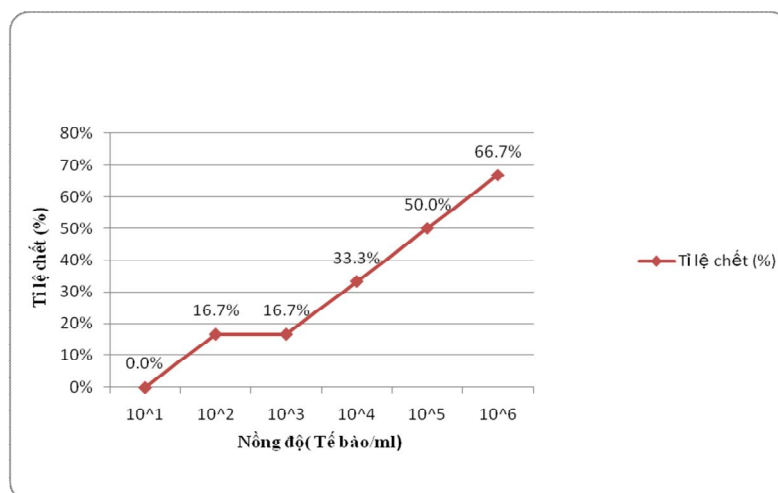
**Kết quả xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *A. hydrophila*, *A. caviae* trên cá rô phi vằn**

**Kết quả xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *A. hydrophila***

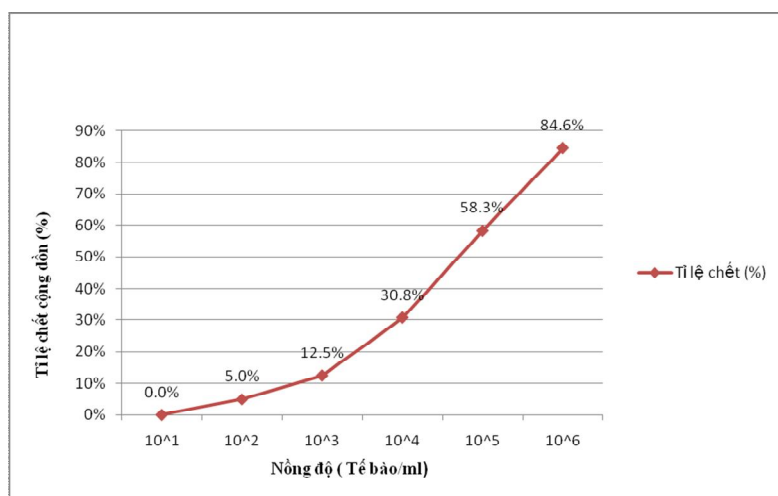
Kết quả thí nghiệm xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *A. hydrophila* được trình bày qua bảng 3.5, biểu đồ 3.1 và biểu đồ 3.2

**Bảng 3.5. Kết quả xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *A.hydrophila***

Nồng độ (tb/ml)	Số cá thí nghiệm (con)	Số cá chết (con)	Số cá sống (con)	Số cá chết cộng dồn (con)	Số cá sống cộng dồn (con)	Tỉ lệ chết (%)	Tỉ lệ chết cộng dồn (%)
10 <sup>6</sup>	6	4	2	11	2	66,7	84,6
10 <sup>5</sup>	6	3	3	7	5	50,0	58,3
10 <sup>4</sup>	6	2	4	4	9	33,3	30,8
10 <sup>3</sup>	6	1	5	2	14	16,7	12,5
10 <sup>2</sup>	6	1	5	1	19	16,7	5,0
10 <sup>1</sup>	6	0	6	0	25	0,0	0,0



**Biểu đồ 3.1. Tỉ lệ chết của cá trong thí nghiệm xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *A.hydrophila***



**Biểu đồ 3.2. Tỉ lệ chết cộng dồn của cá trong thí nghiệm xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *A.hydrophila***

Từ bảng 3.5, biểu đồ 3.1 và 3.2 chúng tôi có một số nhận xét như sau:

- Ở các nồng độ khác nhau tỉ lệ chết của cá thí nghiệm có sự khác nhau rõ rệt, tỉ lệ chết tỉ lệ thuận với nồng độ vi khuẩn tiêm, tỉ lệ chết của cá thí nghiệm biến thiên từ 66,7% ứng với nồng độ  $10^6$  tế bào/ml xuống còn 0% ứng với  $10^1$  tế bào/ml.

- Ở nồng độ  $10^1$  tỉ lệ chết là 0%. Vậy khi nồng độ vi khuẩn thấp, chỉ 10 tế bào/ml không đủ độc lực để gây chết cá. Do sức đề kháng của cá cao, và nuôi trong điều kiện thí nghiệm nên các yếu tố môi trường đều được quản lý tốt.

- Ở nồng độ  $10^2$  tế bào/ml và  $10^3$  tế bào/ml tỉ lệ chết bằng nhau và bằng 16,7%.

- Tương tự với tỉ lệ chết. Tỉ lệ chết cộng dồn giảm dần theo chiều giảm dần nồng độ vi khuẩn tiêm, tỉ lệ chết cộng dồn của cá thí nghiệm biến thiên từ 84,6% ứng với nồng độ  $10^6$  tế bào/ml xuống còn 0% ứng với  $10^1$  tế bào/ml.

- Tỉ lệ chết cộng dồn tăng nhanh từ nồng độ  $10^3$  tế bào/ml đến  $10^6$  tế bào/ml. Vì ở nồng độ càng cao số cá chết càng nhiều.

- Từ kết quả trên suy ra tỉ lệ cận trên (Pa) và tỉ lệ cận dưới (Pu) của giá trị  $LD_{50}$  lần lượt là 58,3% và 30,8%. Từ đó ta tính được giá trị của x theo công thức:

$$x = (Pa - 50)/(Pa - Pu)$$

$$\text{Do đó } x = (58,3 - 50)/(58,3 - 30,8) = 0,3$$

$$\text{Giá trị } LD_{50} \text{ được xác định theo công thức: } LD_{50} = 10^{(a+x)}$$

Trong đó  $10^a$  là nồng độ tại đó số lượng cá sống và cá chết sau thí nghiệm là 50%, tương ứng trong thí nghiệm này là nồng độ  $10^5$  tế bào/ml.

$$\text{Do vậy } LD_{50} = 10^{(a+x)} = 10^{(5+0,3)} = 10^{5,3}$$

Như vậy giá trị  $LD_{50}$  của vi khuẩn *A. hydrophila* trên cá rô phi vằn *O. niloticus* là  $10^{5,3}$  tương đương với khoảng gần 199.500 tế bào vi khuẩn/ml. Vậy khi nồng độ vi khuẩn *A. hydrophila* đạt  $10^{5,3}$  tế bào/ml thì gây chết 50% số cá rô phi vằn thí nghiệm.

#### **Kết quả xác định liều $LD_{50}$ của vi khuẩn *A. caviae* trên cá rô phi**

Kết quả thí nghiệm xác định liều  $LD_{50}$  của vi khuẩn *A. caviae* được trình bày qua bảng 3.6, biểu đồ 3.3 và biểu đồ 3.4

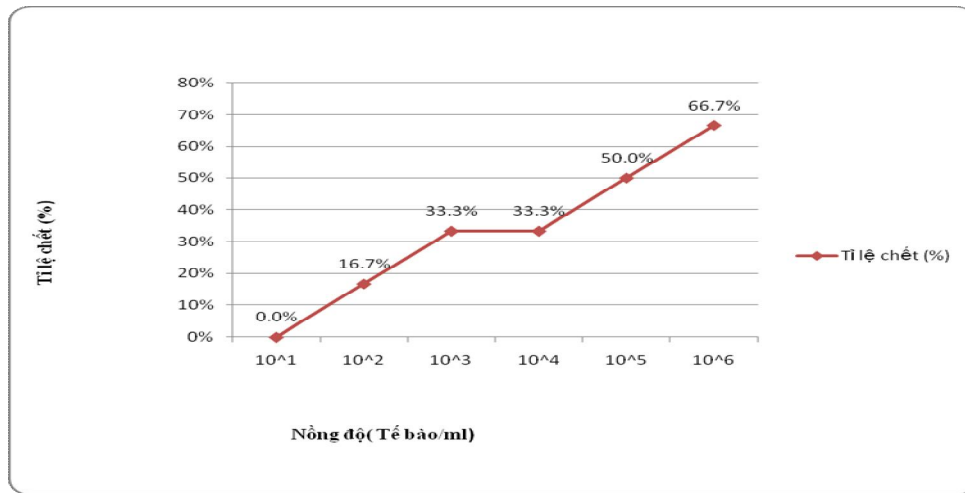
**Bảng 3.6. Kết quả xác định liều  $LD_{50}$  của vi khuẩn *A. caviae***

Nồng độ (tb/ml)	Số cá thí nghiệm (con)	Số cá chết (con)	Số cá sống (con)	Số cá chết cộng dồn (con)	Số cá sống cộng dồn (con)	Tỉ lệ chết (%)	Tỉ lệ chết cộng dồn (%)
$10^6$	6	4	2	12	2	66,7	85,7
$10^5$	6	3	3	8	5	50,0	61,5
$10^4$	6	2	4	5	9	33,3	35,7
$10^3$	6	2	4	3	13	33,3	18,8
$10^2$	6	1	5	1	18	16,7	5,3
$10^1$	6	0	6	0	24	0,0	0,0

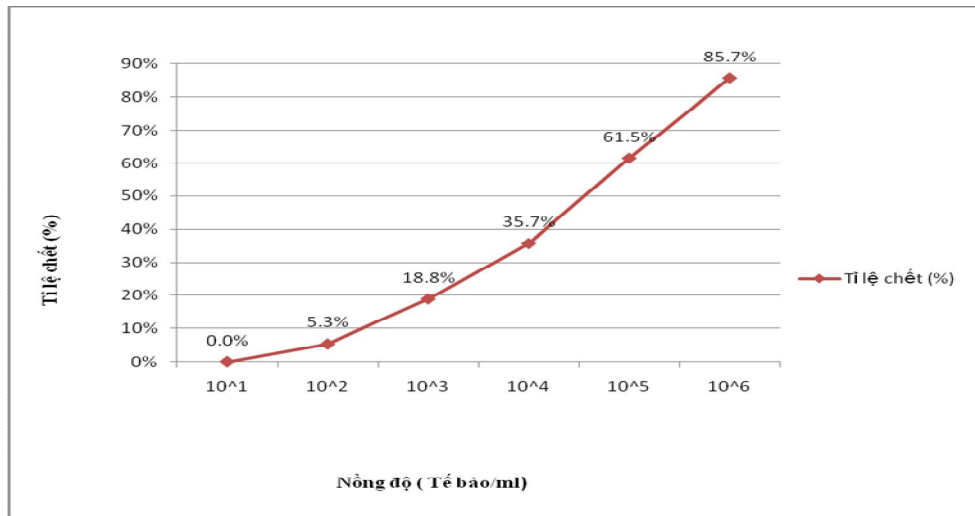
Ở các nồng độ khác nhau tỉ lệ chết của cá thí nghiệm có sự khác nhau rõ rệt, tỉ lệ chết tỉ lệ thuận với nồng độ vi khuẩn tiêm, tỉ lệ chết của cá thí nghiệm biến thiên từ 66,7% ứng với nồng độ  $10^6$  tế bào/ml xuống còn 0% ứng với  $10^1$  tế bào/ml.

Tương tự với tỉ lệ chết. Tỉ lệ chết cộng dồn giảm dần theo chiều giảm dần nồng độ vi khuẩn tiêm, tỉ lệ chết cộng dồn của cá thí nghiệm biến thiên từ 85,7% ứng với nồng độ  $10^6$  tế bào/ml xuống còn 0% ứng với  $10^1$  tế bào/ml.

Từ kết quả trên suy ra giá trị  $LD_{50}$  của vi khuẩn *A. caviae* trên cá rô phi vằn *O. niloticus* là  $10^{5,5}$  tương đương với khoảng gần 282.000 tế bào vi khuẩn/ml. Vậy khi nồng độ vi khuẩn *A. caviae* đạt  $10^{5,5}$  tế bào/ml thì gây chết 50% số cá rô phi vằn thí nghiệm.



**Biểu đồ 3.3. Tỷ lệ chết của cá trong thí nghiệm xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *A.caviae***



**Biểu đồ 3.4 : Tỷ lệ chết cộng dồn của cá trong thí nghiệm xác định liều LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *A.caviae***

Sau khi xác định giá trị LD<sub>50</sub> của vi khuẩn *A. caviae* và *A. hydrophila*. Ta thấy vi khuẩn *A. caviae* có giá trị LD<sub>50</sub> bằng  $10^{5.5}$  cao hơn so với vi khuẩn *A. hydrophila* là  $10^{5.3}$ . Do đó, vi khuẩn *A. caviae* có độc lực mạnh hơn vi khuẩn *A. hydrophila*.

Thu mẫu cá chết và tiến hành mổ khám bệnh tích so với nhóm cá đối chứng, dùng que cấy lấy chất dịch từ gan, thận cấy trên môi trường BHIA. Kết quả cá được tiêm vi khuẩn khi mổ khám có hiện tượng gan và thận sưng to. Trong khi nhóm cá đối chứng không có hiện tượng này. Sau 24 giờ nuôi cấy, khuẩn lạc mọc trên môi trường BHIA có hình dạng và màu sắc giống với khuẩn lạc của vi khuẩn *A. caviae* và *A. hydrophila*. Cá ở các lô thí nghiệm sau khi chết có những dấu hiệu bên ngoài đặc thù của bệnh do *Aeromonas* sp gây ra.

Trong khi đó ở lô đối chứng (+) và đối chứng (-) cá không có hiện tượng chết xảy ra, quan sát bên ngoài cho thấy cá không có dấu hiệu bị bệnh, hoạt động bình thường trong suốt thời gian thí nghiệm. Chứng tỏ ở các lô thí nghiệm, cá bị chết là do vi khuẩn chứ không phải do tác động cơ học tiêm.

### **Kết quả xác định tỉ lệ bảo hộ của vaccin**

Trong quá trình nuôi cấy, phân lập chúng tôi xác định được hai loài vi khuẩn là *A.hydrophila* và *A.caviae*. Nên tôi đã tiến hành xác định tỉ lệ bảo hộ của cả hai loại vaccin trên như sau



Sau khi giữ giống trong môi trường pepton lỏng, lấy vi khuẩn cấy lên môi trường BHIA. Sau 48h, tiến hành pha loãng vi khuẩn ở các nồng độ khác nhau từ  $10^5$ -  $10^8$  tế bào/ml Sau đó bất hoạt bằng formalin 36% với tỉ lệ 1%, đem ủ trong tủ âm 72h tại Khoa Chăn nuôi- Trường Đại học Nông Lâm Huế.

Trước khi tiêm cho cá tiến hành kiểm tra vô trùng vaccin trên môi trường BHIA, kết quả cho thấy không xuất hiện khuẩn lạc của vi khuẩn *Aeromonas* sp.

Các loại vaccin bất hoạt từ các nồng độ vi khuẩn khác nhau ( $10^5$ -  $10^8$  tế bào/ml) được thử nghiệm trên cá khỏe với liều lượng 0,1 ml/cá nhằm xác định hiệu quả và tỉ lệ bảo hộ của từng loại vaccin. Bảy ngày sau liều tiêm thứ nhất, cá được tiêm liều nhắc lại với nồng độ và liều lượng như liều thứ nhất. Ngày thứ 14 tiến hành công cường độc lực với nồng độ vi khuẩn 100LD<sub>50</sub>.

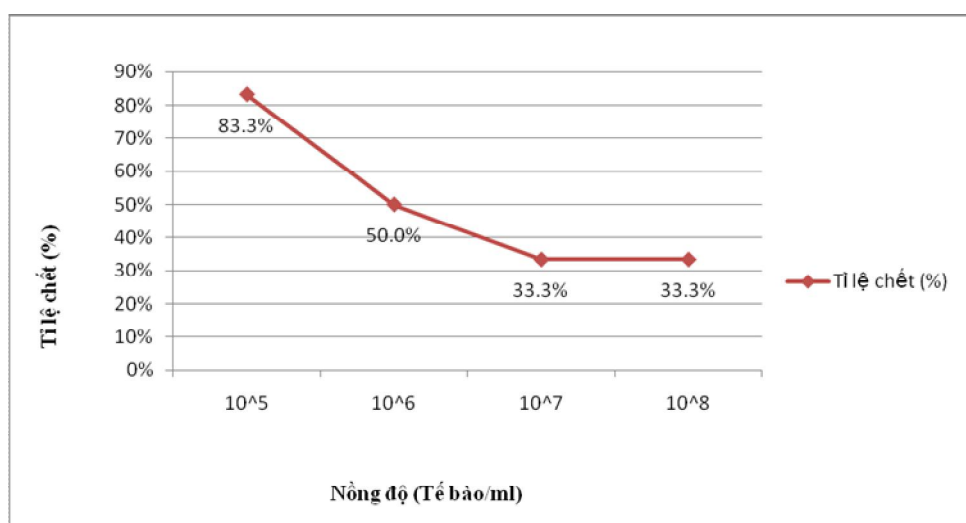
Tiến hành quan sát cá sau khi tiêm, kết quả về tỉ lệ bảo hộ của vaccin được thể hiện qua hai bảng và hai biểu đồ dưới đây

### **Kết quả xác định tỉ lệ bảo hộ của vaccin *A. hydrophila***

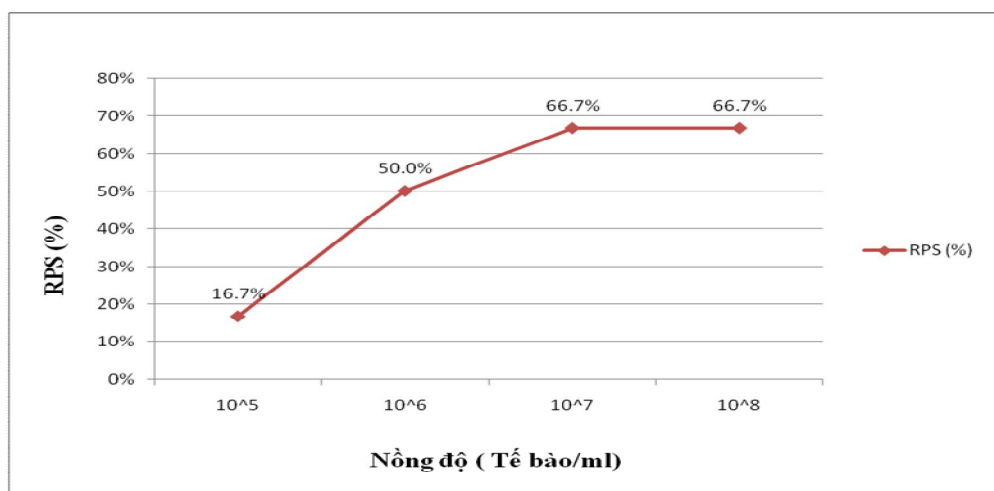
Kết quả thí nghiệm xác định tỉ lệ bảo hộ của vaccin *A. hydrophila* được trình bày qua bảng 3.7.

**Bảng 3.7. Kết quả xác định tỉ lệ bảo hộ của vaccin *A. hydrophila***

Nồng độ (tb/ml)	Số cá (con)	Liều công cường	Số cá chết (con)	Tỉ lệ chết (%)	RPS (%)
$10^8$	6	100LD <sub>50</sub>	2	33,3	66,7
$10^7$	6	100LD <sub>50</sub>	2	33,3	66,7
$10^6$	6	100LD <sub>50</sub>	3	50,0	50,0
$10^5$	6	100LD <sub>50</sub>	5	83,3	16,7
Đối chứng âm	6	100LD <sub>50</sub>	6	100	0
Đối chứng dương	6	100LD <sub>50</sub>	6	100	0



**Biểu đồ 3.5. Tỉ lệ chết của cá trong thí nghiệm xác định tỉ lệ bảo hộ của vaccin *A. hydrophila***



**Biểu đồ 3.6. Tỷ lệ bảo hộ của vaccin *A. hydrophila***

Qua bảng kết quả 3.7 và biểu đồ 3.5, 3.6 chúng tôi nhận thấy:

- Nồng độ vi khuẩn bất hoạt tỉ lệ nghịch với tỉ lệ chết. Nồng độ vi khuẩn bất hoạt càng tăng thì tỉ lệ chết càng giảm. Tỉ lệ chết biến thiên từ 83,3% tương ứng với 10<sup>5</sup> tế bào/ml xuống còn 33,3% ứng với 10<sup>8</sup> tế bào/ml.

- RPS tỉ lệ thuận với nồng độ vi khuẩn bất hoạt trong vaccin, RPS ở nồng độ 10<sup>8</sup> tế bào/ml và 10<sup>7</sup> tế bào/ml đạt 66,7%, nồng độ 10<sup>6</sup> tế bào/ml đạt 50%, vaccin ở nồng độ 10<sup>5</sup> tế bào/ml tỉ lệ bảo hộ chỉ còn 16,7%.

- Vaccin có nồng độ vi khuẩn bất hoạt 10<sup>8</sup> tế bào/ml và 10<sup>7</sup> tế bào/ml có RPS cao nhất và bằng nhau (66,7%).

#### **Kết quả xác định tỉ lệ bảo hộ của vaccin *A. caviae***

Kết quả thí nghiệm xác định tỉ lệ bảo hộ của vaccin *A. caviae* được thể hiện ở qua bảng 3.8 và biểu đồ 3.7 và 3.8.

**Bảng 3.8. Kết quả xác định tỉ lệ bảo hộ của vaccin *A. caviae***

Nồng độ (tb/ml)	Số cá (con)	Liều công cường	Số cá chết (con)	Tỉ lệ chết (%)	RPS (%)
10 <sup>8</sup>	6	100LD <sub>50</sub>	1	16,7	83,3
10 <sup>7</sup>	6	100LD <sub>50</sub>	2	33,3	66,7
10 <sup>6</sup>	6	100LD <sub>50</sub>	3	50,0	50,0
10 <sup>5</sup>	6	100LD <sub>50</sub>	4	66,7	33,3
Đối chứng âm	6	100LD <sub>50</sub>	6	100	0
Đối chứng dương	6	100LD <sub>50</sub>	6	100	0

Từ bảng 3.8 chúng tôi nhận xét như sau:

Nồng độ vi khuẩn bất hoạt tỉ lệ nghịch với tỉ lệ chết. Nồng độ vi khuẩn bất hoạt càng tăng thì tỉ lệ chết càng giảm. Tỉ lệ chết biến thiên từ 66,7% ứng với 10<sup>5</sup> tế bào/ml xuống còn 16,7% ứng với 10<sup>8</sup> tế bào/ml.

Từ bảng 3.8, biểu đồ 3.7 và biểu đồ 3.8, cho thấy:

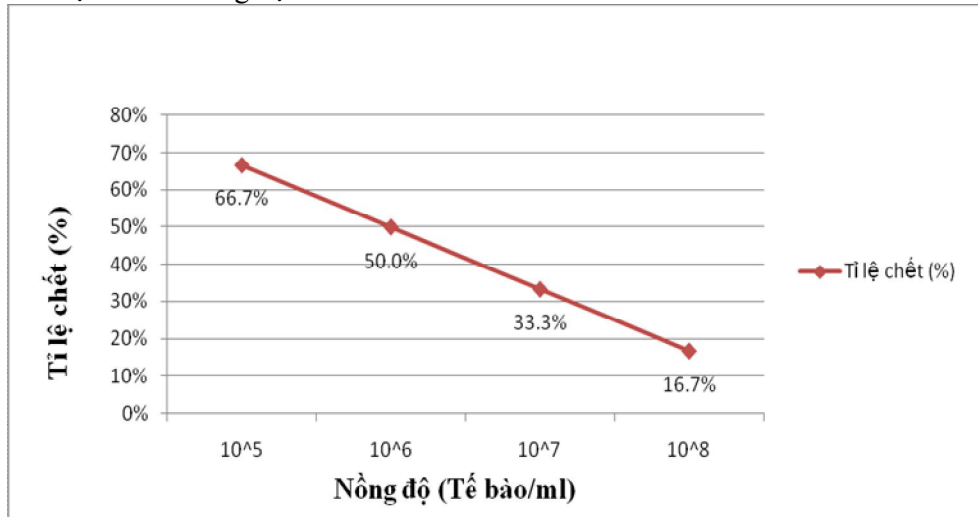
- RPS tỉ lệ thuận với nồng độ vi khuẩn bất hoạt trong vaccin, RPS ở nồng độ 10<sup>8</sup> tế bào/ml cao nhất và bằng 83,3%, nồng độ 10<sup>7</sup> tế bào/ml đạt 66,7%, nồng độ 10<sup>6</sup> tế bào/ml đạt 50%, vaccin ở nồng độ 10<sup>5</sup> tế bào/ml tỉ lệ bảo hộ chỉ còn 33,3%.

- Tỉ lệ bảo hộ của vaccin *A. caviae* cao hơn vaccin *A. hydrophila*

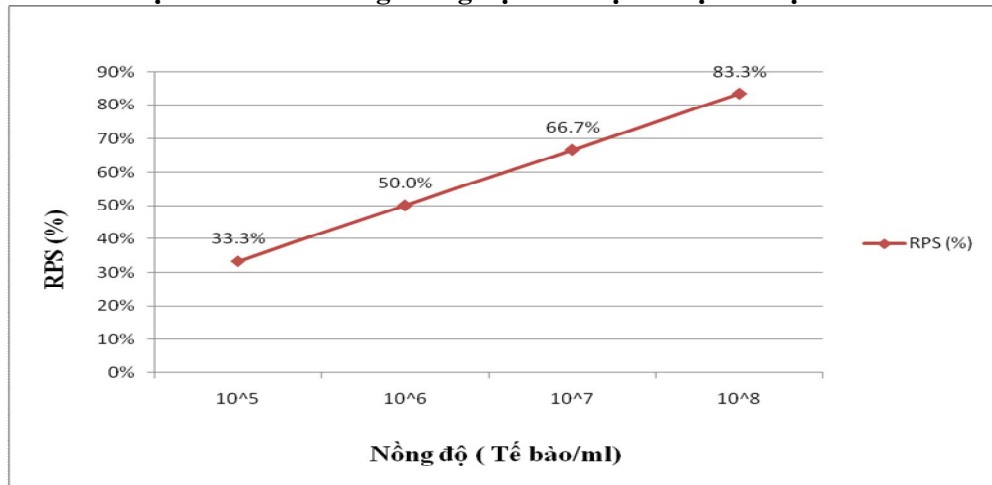
- Cá sau khi tiêm liều vaccin nhắc lại không có hiện tượng chết. Nhưng sau khi công cường độc lực cá chết tập trung từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7 và chết nhiều ở các lô tiêm vaccin có nồng độ vi khuẩn thấp là  $10^5$  tế bào/ml và  $10^6$  tế bào/ml.

- Cá thí nghiệm ở nghiệm thức đối chứng âm và dương sau khi công cường độc lực, cá bắt đầu chết từ ngày thứ nhất và chết hoàn toàn vào ngày thứ 5 của thí nghiệm.

- Cá tiêm vaccin bất hoạt sau khi công cường độc lực không chết hoàn toàn. Điều này chứng tỏ sau khi tiêm vi khuẩn đã được bất hoạt, trong cơ thể cá đã sinh kháng thể và hình thành bảo hộ cho cá thí nghiệm.



**Biểu đồ 3.7. Tỷ lệ chết của cá trong thí nghiệm xác định tỷ lệ bảo hộ của vaccin *A. caviae***



**Biểu đồ 3.8. Tỷ lệ bảo hộ của vaccin *A. caviae***

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### Kết luận

- Chúng tôi xác định được 2 loài vi khuẩn *Aeromonas hydrophila* và *Aeromonas caviae*, gây bệnh xuất huyết trên cá rô phi.

- Ở các nồng độ khác nhau tỷ lệ chết của cá thí nghiệm có sự khác nhau rõ rệt, tỷ lệ chết tỷ lệ thuận với nồng độ vi khuẩn tiêm.

- Nồng độ gây chết 50% cá thí nghiệm của vi khuẩn *A. hydrophila* là  $10^{5.3}$  tế bào/ml và vi khuẩn *A. caviae* là  $10^{5.5}$  tế bào/ml.

- Vaccin có nồng độ vi khuẩn bất hoạt  $10^5$  tế bào/ml có khả năng hình thành bảo hộ cho cá. Vaccin có nồng độ bất hoạt càng cao thì tỷ lệ bảo hộ càng cao. Tỷ lệ bảo hộ của vaccin đối với *A. caviae* (83,3%) cao hơn *A. hydrophila* (66,7%)

### **Kiến nghị**

- Thí nghiệm cần được tiến hành trong điều kiện vô trùng để tránh sai số
- Cần có thêm những nghiên cứu sâu hơn về đặc điểm cơ chế gây bệnh của vi khuẩn *Aeromonas* sp. cũng như cơ chế hình thành miễn dịch ở cá nói chung và cá rô phi nói riêng để giúp hoàn thiện quy trình sản xuất vacxin.
- Tiến hành thử nghiệm kết hợp thêm các chất bổ trợ vacxin để tăng tỉ lệ bảo hộ.

### **TÀI LIỆU THAM KHẢO**

- Bộ Thủy sản, *Chương trình phát triển nuôi trồng thủy sản thời kỳ 1999-2010, dự thảo, đề án “Phát triển nuôi cá rô phi thời kỳ 2003-2010”*, 2002.
- Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Hữu Dũng, Nguyễn Thị Muội, *Bệnh học thủy sản*, NXB Nông Nghiệp Tp Hồ Chí Minh, 2004.
- Nguyễn Hữu Dũng, *Miễn dịch học trong nuôi trồng thủy sản*, 2004.
- Nguyễn Thị Hà, *Báo cáo sơ bộ kết quả khảo sát tình hình cá rô phi chết hàng loạt tại 5 tỉnh miền Bắc*, 2009.
- Nguyễn Văn Hảo, Nguyễn Mạnh Thắng, *Vacxin phòng bệnh đốm trắng trên cá tra, triển vọng và ứng dụng*, Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II, Công ty NAVETCO 23/06/2008, 2008.
- Phạm Văn Thư, *Sử dụng vacxin trong nuôi trồng thủy sản*, Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản I, 2007.
- Aquaculture Training Program Department of aquaculture National Fisheries University of Pusan, *Tilapia Culture*, 1994.
- Hubbert, R.M, *Bacterial diseases in warm water aquaculture*. In: Shilo, M. & Sarig, S. (eds.) *Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1989.
- Kitao, T., Aoki, T. & Sakoh, R., *Epizootic in cultured freshwater fish caused by beta-hemolytic Streptococcus species*. *Fish Pathol.*, 1981.