

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG**

NGUYỄN THỊ THANH THÙY

**NGHIÊN CỨU ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH Ở
CÁ MÚ CHẤM CAM (*Epinephelus coioides*
Hamilton, 1822) NUÔI TẠI KHÁNH HÒA ĐỐI
VỚI VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus***

**Chuyên ngành : Nuôi trồng Thủy sản
Mã ngành : 62 62 03 01**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. TS. NGUYỄN HỮU DŨNG**
- 2. GS.TS. HEIDRUN I. WERGELAND**

KHÁNH HÒA - 2014



**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NHA TRANG**

NGUYỄN THỊ THANH THÙY

**NGHIÊN CỨU ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH Ở
CÁ MÚ CHẤM CAM (*Epinephelus coioides*
Hamilton, 1822) NUÔI TẠI KHÁNH HÒA ĐỐI
VỚI VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus***

LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP



KHÁNH HÒA - 2014

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan công trình nghiên cứu “ **Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch ở cá mú chấm cam (*Epinephelus coioides* Hamilton, 1822) đối với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus***” là kết quả nghiên cứu nghiêm túc của bản thân tôi trong suốt thời gian từ năm 2007-2012 dưới sự hướng dẫn tận tình của Thầy Cô hướng dẫn. Tôi xin cam đoan các kết quả, số liệu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào.

Khánh Hòa, năm 2014

Nghiên cứu sinh

Nguyễn Thị Thanh Thùy

LỜI CẢM ƠN

Trước tiên, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đến Ban giám hiệu Trường Đại học Nha Trang, Khoa Nuôi Trồng Thủy Sản, Khoa Sau Đại học đã tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và thực hiện luận án.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ban Lãnh Đạo Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản III, Dự án “Mô hình hóa ven biển và quản lý sức khỏe cá-NUFUPRO 2007/10086” đã tạo mọi điều kiện thuận lợi về thời gian và hỗ trợ toàn bộ kinh phí cho tôi thực hiện luận án.

Lời cảm ơn chân thành và sâu sắc nhất tôi muốn dành riêng cho hai Thầy Cô giáo hướng dẫn: TS. Nguyễn Hữu Dũng và Giáo sư Heidrun I. Wergeland đã định hướng nghiên cứu, tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Xin chân thành cảm ơn Trung tâm quan trắc cảnh báo môi trường và phòng ngừa dịch bệnh khu vực miền Bắc; Trung tâm quan trắc cảnh báo môi trường và phòng ngừa dịch bệnh khu vực miền Nam đã cung cấp chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu này.

Xin chân thành cảm ơn đến PGS.TS Đỗ Thị Hòa, TS. Lê Văn Bé, TS. Phạm Quốc Hùng, TS. Đặng Thúy Bình, ThS. Nguyễn Thị Thoa đã sẵn lòng giúp đỡ, đóng góp ý kiến quý báu, chia sẻ kinh nghiệm và động viên tinh thần trong quá trình thực hiện luận án.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến các chuyên gia Phòng nghiên cứu miễn dịch - Khoa sinh học - Trường đại học Bergen: TS. Ragnhild A. Jakobsen, TS. Gyri T. Haugland, TS. Eirin F. Pettersen, NCS Anita Ronneseth và KS. Paul H. Lovik đã tận tình hướng dẫn các kỹ thuật phân tích các thông số miễn dịch trong thời gian tôi thực hiện nghiên cứu tại Trường Đại học Bergen, Na Uy.

Cuối cùng, tự đáy lòng cho phép tôi được bày tỏ tình cảm, lòng biết ơn sâu sắc nhất đến những người thân yêu của tôi: Má, anh chị, chồng tôi Nguyễn Văn Hùng và con gái Nguyễn Anh Thi đã luôn bên cạnh động viên khích lệ tinh thần cho tôi trong suốt quá trình học tập và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn và tri ân tất cả tình cảm và sự giúp đỡ quý báu đó.

Khánh Hòa, năm 2014
Nguyễn Thị Thanh Thùy

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC KÝ HIỆU CHỮ VIẾT TẮT	vi
DANH MỤC BẢNG.....	viii
DANH MỤC HÌNH.....	ix
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Vài nét về đối tượng cá mú chấm cam <i>Epinephelus coioides</i>	4
1.1.1. Một số đặc điểm sinh học chủ yếu	4
1.1.2. Nghề nuôi cá mú trên thế giới và tại Việt Nam.....	6
1.1.3. Một số bệnh thường gặp ở cá mú nuôi.....	8
1.2. Vi khuẩn <i>Vibrio</i> và bệnh do vi khuẩn <i>Vibrio</i> gây ra trên cá biển.....	10
1.2.1. Vi khuẩn <i>Vibrio</i>	10
1.2.2. Bệnh do vi khuẩn <i>Vibrio</i> gây ra trên cá biển.....	15
1.3. Đặc điểm hệ miễn dịch ở cá xương	17
1.3.1. Miễn dịch tự nhiên	18
1.3.2. Miễn dịch đặc hiệu	23
1.3.3. Các nhân tố ảnh hưởng đáp ứng miễn dịch ở cá	27
1.4. Sử dụng vaccine và các chất kích thích miễn dịch trong nghề nuôi cá	29
1.4.1. Nghiên cứu ứng dụng các chất kích thích miễn dịch ở cá nuôi	29
1.4.2. Nghiên cứu và sử dụng vaccine ở cá nuôi.....	30
1.5. Tình hình nghiên cứu miễn dịch và vaccine cho cá ở Việt Nam.....	36
CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	40
2.1. Đối tượng, vật liệu, địa điểm và thời gian nghiên cứu	40
2.1.1. Đối tượng.....	40
2.1.2. Vật liệu	40
2.1.3. Địa điểm nghiên cứu	41
2.1.4. Thời gian nghiên cứu.....	41

2.2. Sơ đồ khối nội dung nghiên cứu chính của luận án.....	42
2.3. Phương pháp nghiên cứu	42
2.3.1. Nghiên cứu đặc điểm của vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	42
2.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của β -glucan đến đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu ở cá mú chấm cam.....	45
2.3.3. Nghiên cứu đặc điểm phân tử kháng thể của cá mú chấm cam	50
2.3.4. Nghiên cứu đáp ứng miễn dịch đặc hiệu của cá mú chấm cam đối với vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	52
2.4. Phương pháp xử lý số liệu	56
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	57
3.1. Đặc điểm vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> gây bệnh lở loét ở cá mú chấm cam ..	57
3.1.1. Bệnh xuất huyết lở loét ở cá mú chấm cam nuôi tại Khánh Hòa.....	57
3.1.2. Đặc điểm của vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	59
3.1.3. Độc lực của các chủng <i>Vibrio parahaemolyticus</i> V1, V2, V3 và A đối với cá mú chấm cam.....	67
3.2. Ảnh hưởng của β -glucan đến các thông số miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng bệnh do <i>Vibrio parahaemolyticus</i> gây ra ở cá mú chấm cam.....	70
3.2.1. Thành phần, đặc điểm hình thái và kích thước các loại tế bào máu của cá mú chấm cam	71
3.2.2. Ảnh hưởng của β -glucan đến thành phần bạch cầu trong máu của cá mú chấm cam.....	74
3.2.3. Ảnh hưởng của β -glucan đến chỉ số thực bào của tế bào bạch cầu tiền thân cá mú chấm cam.....	77
3.2.4. Ảnh hưởng của β -glucan đến hoạt tính bùng nổ hô hấp của tế bào bạch cầu tiền thân cá mú chấm cam	80
3.2.5. Ảnh hưởng của β -glucan đến khả năng kháng bệnh do vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> gây ra ở cá mú chấm cam	83
3.3. Đáp ứng miễn dịch đặc hiệu ở cá mú chấm cam đối với vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	86
3.3.1. Đặc điểm phân tử kháng thể IgM ở cá mú chấm cam.....	86
3.3.2. Đáp ứng tạo kháng thể ở cá mú chấm cam đối với 4 chủng vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> bất hoạt formalin không có FIA	88

3.3.3. Đáp ứng miễn dịch dịch thể và khả năng kháng bệnh của cá mú chấm cam sau khi gây miễn dịch bằng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* V3 bất hoạt bằng formalin có bổ sung chất bổ trợ FIA 89

CHƯƠNG 4: KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT Ý KIẾN 102

Kết luận..... 102

Đề xuất ý kiến 103

TÀI LIỆU THAM KHẢO..... 104

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

PHỤ LỤC

DANH MỤC KÝ HIỆU CHỮ VIẾT TẮT

Viết tắt	Viết đầy đủ tiếng Anh	Viết đầy đủ tiếng Việt (Nếu có)
BA	Blood agar base	Môi trường thạch máu
BHI	Brain Heart Infusion	Môi trường nuôi cấy vi khuẩn
CFU	Colony Forming Unit	Đơn vị tính khuẩn lạc vi khuẩn
CMI	Cell-Mediated Immunity	Miễn dịch qua trung gian tế bào
CRP	C-reaction protein	Protein phản ứng C
DI	Direct Immersion	Ngâm trực tiếp
ĐU'MD		Đáp ứng miễn dịch
FCA	Freund's complete Adjuvant	Chất bổ trợ toàn phần Freund
FIA	Freund's Incomplete Adjuvant	Chất bổ trợ bán phần Freund
HGNNV	Humpback grouper nervous necrosis virus	Loại virus gây hoại tử thần kinh ở cá mú lưng gù
HI	Hyperosmotic Immersion	Ngâm trong dung dịch ưu trương
HRP	Horseradish peroxidase	
i-ELISA	indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay	Kiểm định hấp phụ miễn dịch liên kết enzyme gián tiếp
Ig	Immunoglobulin	globulin miễn dịch
IgM	Immunoglobulin M	globulin miễn dịch lớp M
IL-1	Interleukin 1	
kDa	Kilo Dalton	Đơn vị tính khối lượng phân tử protein
LD ₅₀	Lethal dose 50	Liều gây chết 50%
LPS	Lipopolysacharides	
MAC	Membrane attacking complex	Phức hợp tấn công màng
MAM	Multivalent Adhesion Molecule	Phân tử gắn kết đa trị
MHC II	Major histocompatibility complex	Phức hợp hòa hợp mô chủ yếu lớp II
NB	Nutrient Broth	Môi trường dinh dưỡng dạng lỏng
NCC	Non-specific cytotoxic cell	Tế bào độc không đặc hiệu
NK	Natural killer cell	Tế bào diệt tự nhiên
NTTS		Nuôi trồng thủy sản

OD	Optical Density	Mật độ quang
OMP	Outer Membrane Protein	Protein ngoại mạc
PA	Phagocytosis activity	Hoạt tính thực bào
PBS	Phosphate Buffered Saline	Dung dịch đệm muối photphat
RBA	Respiratory burst activity	Hoạt tính bùng nổ hô hấp
RPS	Relative Percent Survival	Hệ số sinh tồn tương đối
RPP	Relative Percent Protection	Hệ số bảo vệ tương đối
SAP	Serum Amyloid Protein	Protein huyết thanh dạng sợi
SDS-	Sodium Dodecyl Sulfate -	Điện di trên gel polyacrylamide có SDS
PAGE	Polyacrylamide Gel Electrophoresis	
sIg	Surface immunoglobuline	Phân tử globulin miễn dịch bề mặt
TCBS	Thiosulphate citrate bile salt agar	Môi trường phân lập vi khuẩn <i>Vibrio</i>
TDH	Thermostable direct haemolysin	Độc tố gây dung huyết bền nhiệt
TLH	Thermolabile haemolysin	Độc tố gây dung huyết không bền nhiệt
α TNF	alpha Tumor Necrosis Factor	Yếu tố anpha gây hoại tử khối u
TNGB		Tác nhân gây bệnh
TSA	Trypticase Soya Agar	Môi trường thạch dinh dưỡng tổng hợp
TSB	Trypticase Soya Broth	Môi trường lỏng dinh dưỡng tổng hợp
TRH	<i>tdh</i> -related hemolysin	Độc tố gây dung huyết liên quan <i>tdh</i>
Vibriosis		Bệnh do vi khuẩn <i>Vibrio</i>
VNN	Viral Nervous Necrosis	Bệnh hoại tử thần kinh do vi rút
VSV		Vi sinh vật

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1: Bệnh do vi khuẩn <i>Vibrio</i> trên cá mú nuôi.....	9
Bảng 3.1: Đặc điểm hình thái, sinh hóa, sinh lý của 4 chủng vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> ...	60
Bảng 3.2: Kích thước của các loại tế bào máu ở cá mú chấm cam <i>Epinephelus coioides</i>	72
Bảng 3.3: Sự biến đổi tỷ lệ các loại bạch cầu trong máu ở cá mú chấm cam sau 2 tuần được cho ăn β -glucan	74
Bảng 3.4: Hoạt tính thực bào của tế bào bạch cầu tiền thận cá mú chấm cam khi được bổ sung β -glucan vào thức ăn ở các nồng độ khác nhau.....	77
Bảng 3.5: Tỷ lệ chết tích lũy và hệ số bảo hộ của vi khuẩn <i>Vibrio parahaemolyticus</i> bất hoạt bằng formalin đối với cá mú <i>Epinephelus coioides</i>	99