

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

---



**PHẠM TUẤN ANH**

**PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH  
SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *AEROMONAS HYDROPHILA*  
GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ CHÉP  
VÀ BIỆN PHÁP ĐIỀU TRỊ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ THÚ Y**

**THÁI NGUYÊN - 2016**

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM



**PHẠM TUẤN ANH**

**PHÂN LẬP VÀ NGHIÊN CỨU MỘT SỐ ĐẶC TÍNH  
SINH HỌC CỦA VI KHUẨN *AEROMONAS HYDROPHILA*  
GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT TRÊN CÁ CHÉP  
VÀ BIỆN PHÁP ĐIỀU TRỊ**

**Chuyên ngành: Thú y**

**Mã số: 60 64 01 01**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ THÚ Y**

**Người hướng dẫn khoa học:**

- 1. GS.TS. NGUYỄN QUANG TUYẾN**
- 2. PGS.TS. PHẠM THỊ TÂM**

**THÁI NGUYÊN - 2016**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan rằng, số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận văn này là hoàn toàn trung thực và chưa từng được sử dụng để bảo vệ một học vị nào.

Tôi xin cam đoan rằng, mọi sự giúp đỡ cho việc hoàn thành luận văn này đã được cảm ơn và các thông tin trích dẫn trong bài luận văn đều được ghi rõ nguồn gốc.

*Thái Nguyên, tháng 9 năm 2016*

**Tác giả**

**Phạm Tuấn Anh**

## LỜI CẢM ƠN

Trong suốt thời gian học tập và hoàn thành luận văn, với sự nỗ lực của bản thân, tôi đã nhận được sự giúp đỡ, hướng dẫn tận tình của nhiều cá nhân và tập thể. Tôi xin được đặc biệt bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc và cảm ơn chân thành tới:

Giảng viên hướng dẫn khoa học: ***GS.TS. Nguyễn Quang Tuyên, Đại học Nông Lâm Thái Nguyên và PGS.TS. Phạm Thị Tâm, Viện Đại học Mở Hà Nội*** đã trực tiếp hướng dẫn, chỉ bảo tôi hết sức tận tình trong suốt quá trình nghiên cứu và hoàn thành Luận văn của mình.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo, Ban chủ nhiệm khoa và các thầy cô giáo Khoa Chăn nuôi Thú y - Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy, cô giáo công tác tại Viện Đại học Mở Hà Nội và Viện Khoa học sự sống - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ hoàn thành Luận văn này. Tôi cũng xin trân trọng cảm ơn lãnh đạo và cán bộ nhân viên các trạm Thú y Văn Quan, Cao Lộc và Đình Lập thuộc Chi cục Thú y tỉnh Lạng Sơn, đã giúp tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Cuối cùng tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc về sự ủng hộ, động viên, giúp đỡ của gia đình, bạn bè và đồng nghiệp trong suốt thời gian học tập, nghiên cứu và hoàn thành tốt luận văn này.

Trong quá trình thực hiện luận văn không tránh khỏi thiếu sót. Kính mong được sự góp ý nhận xét của quý thầy cô để giúp Tôi có nhiều kinh nghiệm bổ ích cho công việc và cuộc sống sau này.

*Thái Nguyên, tháng 9 năm 2016*

**Tác giả**

**Phạm Tuấn Anh**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT .....	vi
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH, BIỂU ĐỒ .....	viii
<b>MỞ ĐẦU</b> .....	1
1. Tính cấp thiết của đề tài .....	1
2. Mục đích của đề tài .....	2
3. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài .....	3
<b>Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU</b> .....	4
1.1. Tình hình bệnh do vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	4
1.1.1. Tình hình trên thế giới.....	4
1.1.2. Tình hình trong nước.....	4
1.2. Một số đặc điểm về vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> , gây bệnh xuất huyết trên cá chép.....	5
1.2.1. Đặc điểm vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	5
1.2.2. Cơ chế gây bệnh.....	8
1.3. Yếu tố độc tố và gen gây bệnh.....	9
1.4. Biểu hiện bệnh.....	10
1.6. Mùa vụ xuất hiện bệnh.....	13
1.7. Cơ chế tạo vacin phòng bệnh cho cá.....	13
1.8. Điều trị bệnh xuất huyết ở cá do vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> gây ra ....	13
1.8.1. Điều trị bằng kháng sinh .....	14
1.8.2. Sử dụng chất kích thích miễn dịch.....	15
<b>Chương 2: ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU</b>	16
2.1. Đối tượng nghiên cứu.....	16

2.2. Địa điểm nghiên cứu .....	16
2.3. Thời gian thực hiện .....	16
2.4. Nội dung .....	16
2.5. Vật liệu .....	16
2.5.1. Thiết bị và dụng cụ phòng thí nghiệm .....	16
2.5.2. Môi trường và hóa chất .....	17
2.6. Phương pháp nghiên cứu.....	19
2.6.1. Phương pháp nghiên cứu dịch tễ.....	19
2.6.2. Phân lập vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	19
2.6.3. Phương pháp xác định một số đặc điểm sinh vật học của các chủng <i>A. hydrophila</i> phân lập được.....	21
2.6.4. Xác định các yếu tố của gây bệnh của các chủng vi khuẩn <i>A.</i> <i>hydrophila</i> phân lập được .....	24
2.6.5. Phương pháp xác định độc lực và khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập được.....	26
2.6.6. Phương pháp tách độc tố.....	27
2.6.7. Phương pháp xác định khả năng miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập được.....	28
2.6.8. Phương pháp xử lý số liệu .....	28
<b>Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....</b>	<b>29</b>
3.1. Kết quả điều tra tình hình dịch tễ bệnh xuất huyết trên cá chép tại 1 số điểm nuôi cá ở 1 số huyện của tỉnh Lạng Sơn .....	29
3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn <i>Aeromonas</i> spp. gây bệnh trên cá chép	31
3.3. Kết quả xác định điều kiện nuôi cấy thích hợp và khả năng gây dung huyết của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	38
3.3.1. Nhiệt độ và thời gian nuôi cấy .....	38
3.3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến khả năng gây dung huyết thạch máu của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	41

3.3.3. Ảnh hưởng của độ pH đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	42
3.3.4. Ảnh hưởng của độ mặn (NaCl) đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	44
3.3.5. Kết quả xác định độc lực của các chủng <i>A. hydrophila</i> phân lập được trên động vật thí nghiệm .....	45
3.4. Kết quả xác định các gen độc tố của các chủng <i>A. hydrophila</i> gây bệnh cho cá chép .....	47
3.5. Khả năng gây bệnh cho cá chép của chủng vi khuẩn phân lập .....	48
3.5.1. Kết quả gây nhiễm cá bằng độc tố Aerolysin .....	49
3.5.2. Gây nhiễm bằng vi khuẩn .....	50
3.6. Kết quả xác định tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập được .....	51
3.7. Kết quả điều trị thử nghiệm điều trị bằng kháng sinh .....	54
<b>KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ</b> .....	57
<b>TÀI LIỆU THAM KHẢO</b> .....	59

**DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT**

(-)	: Âm tính
(+)	: Dương tính
<i>A. hydrophila</i>	: <i>Aeromonas hydrophila</i>
ATC	: Aerolysin Cytotoxic enterotoxin
BHI	: Brain Heart Infusion
BXH	: Bệnh xuất huyết
KIA	: Kligler Iron Agar
LB	: Lysogeny Broth
LPS	: Lipopolysacharide
Môi trường LB	: Môi trường Luria-Bertani
Môi trường TSA	: Môi trường tryptone casein soy agar
MRS	: DE MAN, ROGOSA, SHARPE
NF - K $\beta$	: <i>Nuclear Factor-kappa B</i>
PBS	: Phosphate buffer saline
PCA	: <i>Plate count agar</i>
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PE	: Polyethylene
TTSS	: Type III secretion system
VAC	: Vườn ao chuồng



## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 3.1. Điều tra tình hình cá mắc bệnh xuất huyết tại các ao nuôi.....	30
Bảng 3.2. Kết quả phân lập vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	33
Bảng 3.3. Một số đặc tính sinh vật học điển hình của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập được trên cá chép.....	35
Bảng 3.4: Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> chủng C5 .....	39
Bảng 3.5: Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> chủng C8 .....	40
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến khả năng gây dung huyết thạch máu của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> C5 và C8 .....	41
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của pH lên khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn.....	43
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của nồng độ muối lên khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	45
Bảng 3.9: Kết quả xác định độc lực của một số chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> trên chuột bạch .....	46
Bảng 3.10. Đặc điểm hai cặp môi sử dụng phát hiện các gen độc tố của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> gây bệnh trên cá chép.....	47
Bảng 3.11. Kết quả gây nhiễm vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> Chủng .... (số cá gây nhiễm 30 con/một thí nghiệm về nồng độ .....	51
Bảng 3.12: Kết quả xác định tính miễn cảm với kháng sinh của các chủng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập được.....	52
Bảng 3.13: Kết quả thực nghiệm phác đồ điều trị .....	54

## DANH MỤC CÁC HÌNH, BIỂU ĐỒ

### Hình

Hình 3.1: Mô khám cá chép nghi nhiễm vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	29
Hình 3.2. Hình thái khuẩn lạc vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> mọc trên môi trường thạch máu .....	33
Hình 3.3. Hình dạng vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> ở vật kính 100X .....	36
Hình 3.4. Kết quả phản ứng KIA trên thạch nghiêng của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập được .....	37
Hình 3.5. Kết quả phản ứng sinh Indol của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập được .....	37
Hình 3.6: PCR phát hiện hai gen độc tố <i>Aer</i> và <i>Hyl</i> của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i>	48
Hình 3.7: Hình ảnh kết tinh độc tố .....	49
Hình 3.8. Kết quả đánh giá tính miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> phân lập từ cá chép bệnh .....	53

### Biểu đồ

Biểu đồ 3.1: Tỷ Lệ các ao có cá mắc bệnh tại 3 huyện của tỉnh Lạng Sơn .....	31
Biểu đồ 3.2: Tỷ lệ phân lập vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> từ các mẫu bệnh phẩm lấy tại Lạng Sơn .....	34
Biểu đồ 3.3: Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> chủng C5 .....	39
Biểu đồ 3.4: Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến khả năng sinh trưởng của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> chủng C8 .....	39
Biểu đồ 3.5. Ảnh hưởng của pH lên khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	43
Biểu đồ 3.6. Ảnh hưởng của nồng độ muối lên khả năng sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn <i>A. hydrophila</i> .....	44
Biểu đồ 3.7: Hiệu quả một số phác đồ điều trị bệnh xuất huyết trên cá chép nuôi tại tỉnh Lạng Sơn .....	56