

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

PHẠM THỊ HẢI YẾN

**NGHIÊN CỨU VI KHUẨN *Vibrio* GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT
TRÊN CÁ HỒNG MỸ *Sciaenops ocellatus* (LINNAEUS, 1766)
VÀ THỬ NGHIỆM BIỆN PHÁP PHÒNG TRỊ BỆNH
BẰNG DIỆP HẠ CHÂU (*Phyllanthus amarus*)**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ THỦY SẢN

THỪA THIÊN HUẾ - 2022

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM

PHẠM THỊ HẢI YẾN

**NGHIÊN CỨU VI KHUẨN *Vibrio* GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT
TRÊN CÁ HỒNG MỸ *Sciaenops ocellatus* (LINNAEUS, 1766)
VÀ THỬ NGHIỆM BIỆN PHÁP PHÒNG TRỊ BỆNH
BẰNG DIỆP HẠ CHÂU (*Phyllanthus amarus*)**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ THỦY SẢN
NGÀNH: NUÔI TRỒNG THỦY SẢN
MÃ SỐ: 9620301**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC
PGS.TS. NGUYỄN QUANG LINH
PGS.TS. NGUYỄN DUY QUỲNH TRÂM**

THỪA THIÊN HUẾ - 2022

Công trình hoàn thành tại:

TRƯỜNG ĐẠI HỌC NÔNG LÂM HUẾ, ĐẠI HỌC HUẾ

Người hướng dẫn: 1. PGS.TS. NGUYỄN QUANG LINH

2. PGS.TS. NGUYỄN DUY QUỲNH TRÂM

Phản biện 1 :

.....

.....

Phản biện 2 :

.....

.....

Phản biện 3 :

.....

.....

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp Đại học Huế họp tại:

.....

Vào hồi giờ, ngày 5..... thángnăm 20....

Có thể tìm hiểu luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Trung tâm Học liệu – Đại học Huế
- Thư viện Trường Đại học Nông Lâm Huế

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Cá Hồng mỹ hay còn gọi là cá Đù đỏ có tên khoa học là *Sciaenops ocellatus*, một loài cá biển trong họ cá Lù đù (*Sciaenidae*). Ngoài tự nhiên chúng phân bố chủ yếu ở vùng vịnh Mexicô và duyên hải Tây Nam nước Mỹ, là loài có khả năng thích nghi tốt, có thể sống được ở trong môi trường nước ngọt, nước lợ, nước mặn nhưng thích hợp nhất vẫn là nước lợ và nước mặn. Với tốc độ tăng trưởng nhanh, cá Hồng mỹ dần dần là đối tượng nuôi phổ biến tại Việt Nam, và đây cũng là một trong những đối tượng cá biển đã và đang được nuôi chính tại tỉnh Thừa Thiên Huế. Đồng thời đây cũng là một trong những loài, đối tượng được ưu tiên nghiên cứu, chọn tạo giống nhằm phát triển nuôi biển trở thành một ngành sản xuất hàng hóa quy mô lớn, công nghiệp phù hợp với chiến lược phát triển nuôi trồng trên biển đến năm 2030 và tầm nhìn đến năm 2045.

Trong những năm gần đây, bệnh do vi khuẩn *Vibrio* gây ra những thiệt hại lớn trên cá Hồng mỹ là một trong những thách thức chính cho sự phát triển nghề nuôi cá lồng tại Thừa Thiên Huế.

Trong quá trình nuôi cá Hồng mỹ thương phẩm, để hạn chế thiệt hại do dịch bệnh gây ra, người nuôi thường áp dụng nhiều biện pháp để phòng và trị bệnh, trong đó kháng sinh được sử dụng phổ biến để điều trị bệnh do vi khuẩn, đặc biệt là *Vibrio* gây ra trên động vật thủy sản. Tuy nhiên trước tình hình lạm dụng kháng sinh trong nuôi trồng thủy sản đã gây nên hiện tượng kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh, gây tồn dư vào sản phẩm, môi trường và ảnh hưởng đến sức khỏe cho con người, do đó việc nghiên cứu chiết xuất các hoạt chất sinh học từ thực vật đã trở thành một trong những cách tiếp cận mới thay thế cho việc sử dụng kháng sinh như hiện nay. Diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*) là loại thảo dược mọc phổ biến tại Việt Nam, đặc biệt ở các tỉnh miền Trung Việt Nam. Một số nghiên cứu sử dụng thảo dược phòng trị bệnh cho động vật thủy sản cho thấy các hợp chất alkanoid và flavonoid có trong cây Diệp hạ châu có khả năng kháng khuẩn cao.

Xuất phát từ cơ sở lý luận và thực tiễn trên, đề tài: “**Nghiên cứu vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus, 1766) và thử nghiệm biện pháp phòng trị bệnh bằng Diệp hạ châu (*Phyllanthus amarus*)**” nhằm cung cấp

dẫn liệu về bệnh do vi khuẩn *Vibrio* gây ra trên cá và thử nghiệm cao chiết từ cây Diệp hạ châu góp phần vào việc kiểm soát dịch bệnh ở cá Hồng mỹ nói riêng và ở cá biển nói chung ngày càng hiệu quả hơn.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu vi khuẩn *Vibrio* chính gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ và giải pháp phòng trị bệnh xuất huyết ở cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) bằng Diệp hạ châu để nâng cao hiệu quả nuôi cá biển, từ đó làm cơ sở để sản xuất cá Hồng mỹ theo hướng xuất khẩu.

3. Ý nghĩa của luận án

Kết quả của luận án đã cung cấp dữ liệu khoa học về các chủng vi khuẩn *Vibrio* có mang các gen độc tố gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ nuôi lồng ở Thừa Thiên Huế, ứng dụng cao chiết Diệp hạ châu để ức chế vi khuẩn *Vibrio* và giảm tác hại của bệnh gây ra.

4. Những đóng góp của luận án

Bằng kỹ thuật PCR, chúng tôi đã xác định sự hiện diện của 48 chủng vi khuẩn *Vibrio*, trong đó có 39 chủng *Vibrio* có mang ít nhất một trong các gen độc lực (*trh*, *tdh*, *toxR* và *tlh*) và 9 chủng *Vibrio* không có mang các gen độc lực trên và đã công bố 48 đoạn gen *16S rRNA* trên ngân hàng gen thế giới (Genbank) về thông tin dữ liệu *Vibrio*;

Xác định vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ nuôi lồng là chủng *V. alginolyticus*, đây là tác nhân chính có mang đồng thời 3 gen độc tố (*tdh*, *toxR* và *tlh*) hoặc (*trh*, *toxR* và *tlh*);

Xác định đặc điểm sinh hóa và bệnh học của vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ. Đồng thời khảo sát mức độ nhạy cảm của vi khuẩn đối với một số loại kháng sinh phổ biến trong nuôi trồng thủy sản hiện nay.

Ứng dụng cao chiết thảo dược Diệp hạ châu (*P. amarrus*) trong thử nghiệm ức chế vi khuẩn *V. alginolyticus*, hướng đến việc sử dụng thảo dược trong nuôi trồng thủy sản.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tổng quan về cá Hồng mỹ và bệnh xuất huyết xảy ra trên cá Hồng mỹ

Cá Hồng mỹ phân bố nhiều ở vịnh Mexico và vùng duyên hải Tây Nam nước Mỹ. Với sự phát triển của công nghệ nuôi trồng thủy sản ngày càng cao, việc nuôi thương phẩm cá Hồng mỹ dần dần trở thành đối tượng được quan tâm và nuôi phổ biến trên toàn thế giới. Cá Hồng mỹ đã di nhập vào Việt Nam từ năm 1999, là loài cá nước mặn lợ có giá trị kinh tế, dễ nuôi, thịt thơm ngon, có hàm lượng dinh dưỡng cao. Kết quả nghiên cứu của Đặng Thanh Long và cs (2019), đã phân lập và định danh được một chủng *V. parahaemolyticus*-01 gây bệnh xuất huyết lở loét ở cá Hồng mỹ nuôi tại Thừa Thiên Huế và đã tạo dòng gen thermolabile hemolysin (tlh) mã hóa tạo kháng nguyên độc tố không bền nhiệt tlh có kích thước 1257 bp.

Kết quả nghiên cứu phân lập các chủng vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh lở loét, xuất huyết trên cá Hồng mỹ nuôi lồng tại Hải Dương đã xác định được sự xuất hiện của các loài *V. vulnificus*; *V. brasiliensis*; *V. cholerae* và *V. parahaemolyticus* chỉ có mang 01 gen độc tố tlh, trong đó loài *V. vulnificus* có tần suất xuất hiện nhiều nhất 42,86%

1.2. Ứng dụng Diệp hạ châu trong phòng và trị bệnh trên động vật thủy sản

Alkaloid và flavonoid là hai hợp chất có khả năng kháng khuẩn chiếm tỷ lệ cao trong cây Diệp hạ châu

Xuất phát từ những tác dụng của cây Diệp hạ châu đối với bệnh gan, các nhà nghiên cứu đã tiến hành các thử nghiệm sử dụng chiết xuất từ cây Diệp hạ châu để phòng bệnh cho tôm nuôi. Một số hộ nuôi đã sử dụng cây Diệp hạ châu đun nước cô đặc trộn vào thức ăn cho tôm ăn để phòng bệnh và tăng cường sức đề kháng.

Ngoài ra, cao chiết từ cây Diệp hạ châu còn giúp tăng đáng kể tỷ lệ sống, tăng trưởng và nồng độ thành phần sinh hóa của tôm Càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) khi cho ăn ấu trùng artemia được làm giàu bằng cao chiết này. Kết quả nghiên cứu của Trần Vinh Phương và cs (2019), đã xác định hoạt tính kháng khuẩn và nồng độ ức chế tối thiểu của dịch chiết từ Diệp hạ châu đối với vi khuẩn *V.*

parahaemolyticus và *Vibrio* sp. gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) ở tôm chân trắng (*L. vannamei*) nuôi tại Thừa Thiên Huế.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Phạm vi và đối tượng nghiên cứu

2.1.1. Phạm vi nghiên cứu

+ Địa điểm thu mẫu: Cá Hồng mỹ có biểu hiện lâm sàng của bệnh xuất huyết được thu tại các hộ nuôi cá lồng ở xã Hải Dương, thành phố Huế và thị trấn Thuận An, thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế.

+ Đối tượng nghiên cứu: Vi khuẩn *Vibrio* spp. phân lập từ cá Hồng mỹ (*S. ocellatus*) bị bệnh xuất huyết tại Thừa Thiên Huế và cây Diệp hạ châu (*P. amarus*) được thu tại Thừa Thiên Huế.

Nghiên cứu được tiến hành trong vòng 4 năm 2018- 2022.

Địa điểm nghiên cứu:

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, 102 Phùng Hưng, Huế
Viện Công nghệ sinh học, Đại học Huế, Phú Thượng, Huế

2.2. Nội dung nghiên cứu

- Khảo sát tình hình nuôi và dịch bệnh trên cá Hồng mỹ tại một số khu vực ở Thừa Thiên Huế

- Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ.

- Nghiên cứu một số đặc điểm sinh học của các chủng *Vibrio* phân lập được

- Nghiên cứu sử dụng cao chiết cây Diệp hạ châu trong phòng và điều trị bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Vibrio* ở cá Hồng mỹ

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp điều tra

Nghiên cứu đã được tiến hành thông qua việc điều tra các hộ nuôi cá lồng tại xã Hải Dương (thuộc thị xã Hương Trà, nay thuộc thành phố Huế), các xã Lộc Bình và Vinh Hiền (huyện Phú Lộc) và thị trấn Thuận An (huyện Phú Vang, nay thuộc thành phố Huế) tỉnh Thừa Thiên Huế từ tháng 4/2018. Tổng số có 30 phiếu.

2.3.2. Phương pháp phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ

2.3.2.1. Phương pháp thu mẫu

Tổng số 62 mẫu cá Hồng mỹ nuôi lồng có biểu hiện lâm sàng của bệnh xuất huyết được thu tại 15 hộ nuôi ở 2 địa điểm bao gồm: 35 mẫu cá ở Thuận An và 27 mẫu cá ở Hải Dương, thành phố Huế, Tỉnh Thừa Thiên Huế. Cá bệnh có kích cỡ từ 12,2 – 37,5cm và khối lượng cá đạt từ 24,20 – 591,00g. Sau khi thu, cá được giữ sống trong thùng

xốp và vận chuyển về phòng thí nghiệm để tiến hành phân lập vi khuẩn.

Bảng 2.2. Số mẫu cá bị bệnh xuất huyết thu tại tỉnh Thừa Thiên Huế

Địa điểm thu mẫu	Đợt thu	Thời gian thu mẫu	Số mẫu cá bệnh (con)	Chiều dài (cm) (TB±SD)	Khối lượng (gam/con) (TB±SD)
Thuận An	1	Tháng 6/2019	11	24,8 ± 0,60	188,60 ± 9,20
	2	Tháng 8/2019	24	37,5 ± 1,10	591,00 ± 10,20
Hải Dương	3	Tháng 1/2020	10	14,24 ± 1,10	25,77 ± 1,40
	4	Tháng 3/2020	17	12,2 ± 1,10	24,20 ± 1,50

2.3.2.2. Phương pháp nuôi cấy và phân lập vi khuẩn *Vibrio*

Dùng cồn 70° khử trùng mặt ngoài cơ thể cá, dùng dao mổ và kéo tiệt trùng để mổ cá, quan sát và mô tả các dấu hiệu bệnh lý bên trong. Sau đó, dùng que cấy vô trùng lấy mẫu bệnh phẩm trực tiếp từ các cơ quan như: Não, gan, thận, lách, cấy lên đĩa môi trường TCBS agar (TCBS, Himedia, Ấn độ) và nuôi cấy ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Các khuẩn lạc rời, chiếm ưu thế được cấy chuyển sang môi trường Tryptone Soya Agar (TSA, Himedia, Ấn độ) có bổ sung 2% NaCl (TSA+) và nuôi cấy ở 28°C trong 24 giờ để tiến hành định danh vi khuẩn.

2.3.2.3. Phương pháp định danh vi khuẩn *Vibrio* bằng phương pháp sinh học phân tử

DNA tổng số của các dòng tế bào vi khuẩn *Vibrio* được tách chiết dựa trên phương pháp cải tiến phenol/chloroform theo mô tả của Neumann và cộng sự (1992). Vùng gen *16S rRNA* của các chủng vi khuẩn được phân lập bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu theo mô tả của Frank và cs (2008) là 27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG và 1492R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT

Sản phẩm PCR của vùng gen *16S rRNA* sau khi tinh sạch được sử dụng giải trình tự trực tiếp bằng phương pháp Sanger trên hệ thống ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) tại Công ty Maccrogen, Hàn Quốc (dna.maccrogen.com).

2.3.2.4. Phân tích đa dạng di truyền

- Cây phát sinh chủng loại thể hiện mối quan hệ di truyền được xây dựng bằng phần mềm MEGA X (Molecular Evolution Genetic Analysis), dựa trên phương pháp UPGMA

2.3.3. Phương pháp xác định một số đặc điểm sinh học của của các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập

2.3.3.1. Xác định một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc, tế bào và sinh hóa của các chủng vi khuẩn *Vibrio*:

- Xác định một số đặc điểm hình thái khuẩn lạc, sinh lý, sinh hoá cơ bản được thực hiện theo phương pháp của Buller (2004) đồng thời được khảo sát bằng bộ kit API 20E (Analytical profile index) (Bio-Mérieux, Pháp).

2.3.3.2. Phương pháp PCR phát hiện một số gen độc tố của các chủng *Vibrio* phân lập

Sự hiện diện của các gen độc tố *tlh*, *tdh*, *trh* và *toxR* trong các chủng *Vibrio* theo phương pháp của Luan và cs (2007); Marlina và cs (2007)

2.3.3.3. Phương pháp xác định độc lực của các chủng *Vibrio* phân lập được trên cá Hồng mỹ

Khảo sát các yếu tố độc lực của vi khuẩn *Vibrio* trong điều kiện *in vitro* bao gồm: Khả năng di động của vi khuẩn, Khả năng sản xuất của enzyme caseinase, haemolysin được thực hiện theo phương pháp của Natrah và cs (2011).

2.3.3.4. Phương pháp LD₅₀- Lethal dose 50) liều gây chết 50% cá thí nghiệm

Cá thí nghiệm: Cá Hồng mỹ giống thí nghiệm có chiều dài trung bình là $11,7 \pm 0,7$ cm/con; khối lượng trung bình đạt $15,6 \pm 2,6$. g/con

Chuẩn bị vi khuẩn

Các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. được nuôi tăng sinh trong môi trường TSB (TSB, Merck, Đức) có bổ sung 2% NaCl, nuôi ở 28°C trong 24 giờ ở tủ nuôi cấy với tốc độ lắc 150 vòng/phút.

Cách tiến hành: 4 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* gây chết cá đạt tỷ lệ 100% trong 3 ngày thí nghiệm được chọn để xác định liều gây chết LD₅₀. Thí nghiệm xác định giá trị LD₅₀ được bố trí 5 nghiệm thức bao gồm: 4 nghiệm thức thí nghiệm (cá ở mỗi nghiệm thức được tiêm 0,1mL huyền phù vi khuẩn ở mật độ vi khuẩn *V. alginolyticus* từ 10⁵ đến 10⁸ CFU/mL) và 1 nghiệm thức đối chứng (cá được tiêm 0,1 mL nước muối sinh lý (0,85% NaCl)). Tỷ lệ chết

được theo dõi trong 14 ngày. Giá trị LD₅₀ được xác định theo phương pháp của Reed and Muench (1938)

2.3.3.5. *Xác định đặc điểm mô bệnh học của cá Hồng mỹ cảm nhiễm*

Tiến hành phân tích mô bệnh học theo phương pháp của Mohamed (2009).

2.3.3.6. *Phương pháp kháng sinh đồ*

Khả năng miễn cảm kháng sinh của vi khuẩn được kiểm tra bằng phương pháp khuếch tán trên đĩa thạch theo phương pháp của Bauer và cs (1966).

2.3.4. *Nghiên cứu sử dụng cao chiết Diệp hạ châu trong phòng và điều trị bệnh xuất huyết do vi khuẩn Vibrio spp. ở cá Hồng mỹ*

2.3.4.3. *Phương pháp xác định hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết cây Diệp hạ châu*

Xác định khả năng kháng khuẩn của cao chiết:

Khả năng kháng khuẩn của cao chiết cây Diệp hạ châu được thực hiện theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch trên môi trường Mueller Hinton Agar (MHA, Himedia, Ấn Độ).

Xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu

Từ thí nghiệm thử hoạt tính kháng khuẩn của cao chiết, nồng độ cao chiết với vòng kháng khuẩn nhỏ nhất sẽ được sử dụng cho thí nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu trên đĩa nhựa 96 giếng với các nồng độ cao chiết khác nhau với 0,01% thuốc nhuộm resazurin

Xác định ngưỡng an toàn của cao chiết cây Diệp hạ châu lên cá thí nghiệm: từ giá trị nồng độ tiêu diệt tối thiểu (được xác định ở trên), thí nghiệm xác định ngưỡng an toàn của dịch chiết cây Diệp hạ châu trên cá Hồng mỹ được bố trí bằng cách trộn cao chiết vào thức ăn INVE với các nồng độ tương ứng trong thời gian thí nghiệm 14 ngày

2.3.4.4. Phương pháp đánh giá hiệu quả phòng bệnh xuất huyết ở cá Hồng mỹ bằng cao chiết Diệp hạ châu

Thí nghiệm ảnh hưởng của cao chiết Diệp hạ châu đến chỉ tiêu số lượng tế bào máu của cá Hồng mỹ

Bảng 2.8. Thiết kế thí nghiệm xác định ảnh hưởng của cao chiết Diệp hạ châu đến các chỉ tiêu huyết học

Thí nghiệm thứ	Số cá thí nghiệm (con)	Thức ăn		Cảm nhiễm <i>V. alginolyticus</i> YHD7
		Công nghiệp	Cao chiết Diệp hạ châu (%)	
NT1	15	+	5	6,5 x 10 ⁵ CFU/mL
NT2	15	+	6	6,5 x 10 ⁵ CFU/mL
NT3	15	+	7	6,5 x 10 ⁵ CFU/mL
NT4	15	+	0	6,5 x 10 ⁵ CFU/mL
NT5	15	+	0	Không cảm nhiễm, tiêm nước muối sinh lý

Ngày thứ 3, bắt đầu cho ăn cao chiết Diệp hạ châu đối với các thí nghiệm thức có bổ sung cao chiết vào thức ăn. Ngày thứ 4 thì bắt đầu cảm nhiễm chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* YHD7 với LD₅₀ = 6,5 x 10⁵ CFU/mL. Tiến hành lấy máu ở động mạch đuôi cá vào ngày thí nghiệm 4, 7, 10, 14 (mỗi lần thu mẫu lấy 03 con/bể) để xác định số lượng tế bào máu. Theo dõi và đánh giá tỷ lệ sống trong 14 ngày thí nghiệm.

Phương pháp xác định các chỉ tiêu huyết học:

Định lượng hồng cầu: số lượng hồng cầu trong máu của cá được xác định theo phương pháp của Natt và Herrick (1952)

Định lượng tổng bạch cầu: tổng loại bạch cầu trong máu cá được xác định theo phương pháp của Hrubec và cs (2000).

Phương pháp xác định tỷ lệ sống của cá:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{Số cá sống còn lại}}{\text{Số cá ban đầu}} \times 100$$

Hiệu quả sử dụng cao chiết Diệp hạ châu bổ sung vào thức ăn được đánh giá bằng tỉ lệ sinh tồn tương đối (relative percentage of survival - RPS) (%) theo công thức (Ellis, 1988):

2.3.4.5. Thí nghiệm ảnh hưởng của cao chiết Diệp hạ châu đến điều trị bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ

Dựa trên cơ sở thí nghiệm phòng bệnh cho cá Hồng mỹ bằng cao chiết Diệp hạ châu. Thí nghiệm điều trị bệnh cho cá Hồng mỹ bằng cao chiết Diệp hạ châu được bố trí với 3 nghiệm thức và 03 lần lặp gồm:

NT1: bổ sung 7% cao chiết DHC vào thức ăn, cảm nhiễm vi khuẩn khuẩn *V. alginolyticus* YHD7 với $LD_{50} = 6,5 \times 10^5$ CFU/mL

NT2: không bổ sung cao chiết vào thức ăn, cảm nhiễm vi khuẩn khuẩn *V. alginolyticus* YHD7 với $LD_{50} = 6,5 \times 10^5$ CFU/mL

NT3: không bổ sung cao chiết vào thức ăn, tiêm nước muối sinh lý

Thí nghiệm được tiến hành trong 14 ngày. Gây cảm nhiễm vào ngày thứ 1 và đến ngày thứ 3 thì bắt đầu bổ sung thức ăn có cao chiết đối với NT3. Theo dõi tỷ lệ chết cá hằng ngày. Đánh giá hiệu quả điều trị bệnh xuất huyết ở cá Hồng mỹ bằng cách xác định tỷ lệ sống và biểu hiện bệnh.

2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel 2016 và SPSS 16.0; phân tích phương sai ANOVA một yếu tố để so sánh sự khác nhau về đường kính kháng khuẩn của cao chiết; độc lực của vi khuẩn và tế bào máu. Kiểm định thống kê được thực hiện ở mức ý nghĩa $p \leq 0,05$ theo phương pháp LSD.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khảo sát tình hình nuôi và dịch bệnh trên cá Hồng mỹ tại Thừa Thiên Huế

3.1.1. Tình hình nuôi cá Hồng mỹ tại Thừa Thiên Huế

Cá Hồng mỹ nuôi lồng ở Thừa Thiên Huế chủ yếu ở các địa phương như: xã Hải Dương, Thuận An, Vinh Hiền và Lộc Bình, kết quả điều tra đã xác định 100 % các hộ dân đều nuôi cá Hồng mỹ bằng nuôi lồng. Người dân nuôi cá Hồng mỹ là 1 vụ/năm. Thời gian nuôi thường vào tháng 11 và tháng 12 hàng năm. Thời gian mỗi vụ nuôi trung bình khoảng 8-10 tháng tùy theo kích cỡ con giống. Nguồn giống thả nuôi cá Hồng mỹ từ nguồn khai thác tự nhiên chỉ chiếm 17,4 %, còn đến 82,6 % các hộ nuôi lấy từ trại giống của địa phương được ương nuôi từ nguồn giống ở Quảng Ninh, Nam Định, Nha Trang. Cá Hồng mỹ được thả nuôi với mật độ 40-70 con/m³.

3.1.2. Tình hình dịch bệnh trên cá Hồng mỹ

Bảng 3.1. Một số bệnh thường gặp trên cá nuôi lồng tại điểm điều tra (n=30)

TT	Bệnh	Số hộ	Tỷ lệ (%)
1	Đĩa cá	7	23,3
2	Hoại tử thần kinh	1	3,3
3	Nấm	2	6,6
4	Xuất huyết, lở loét	23	76,7
5	Đường ruột	5	16,7
6	Sinh bọng	3	10,0

Qua bảng 3.1, cho thấy cá Hồng mỹ bị bệnh và tới 100% thường bắt gặp nhiều nhất là bệnh xuất huyết (23/30 hộ, chiếm 76,7%), đĩa cá (chiếm 23,3%), đường ruột (chiếm 16,7%). Ngoài ra, các đối tượng cá biển này còn mắc một số bệnh như hoại tử thần kinh, nấm, sinh bọng.

3.2. Phân lập và định danh các chủng vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ

3.2.1. Dấu hiệu bệnh lý của cá bị bệnh do vi khuẩn *Vibrio* gây ra

Tất cả các mẫu bệnh phẩm đều có dấu hiệu bệnh lý của bệnh xuất huyết như: Cá bơi lội lơ dờ trên mặt nước, hoạt động chậm chạp, kém linh hoạt, xuất huyết trên thân, ở vây ngực, vây bụng và miệng; giải phẫu bên trong nội quan thấy có hiện tượng tích dịch ở xoang bụng, xuất huyết ở gan (Hình 3.1).



Hình 3.1. Dấu hiệu đặc trưng của cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết với các đặc điểm xuất hiện các đốm đỏ trên phần xoang bụng; vây, và đuôi bị rách và xuất huyết (mũi tên, Hình A,C); gan sưng to và xuất huyết (mũi tên, Hình B); xoang bụng tích dịch nhầy (mũi tên, Hình D)

3.2.2. Kết quả định danh vi khuẩn bằng giải trình tự Nucleotide đoạn gen 16S rRNA của 48 chủng vi khuẩn phân lập được.

3.2.2.2. Kết phân tích trình tự nucleotide vùng gen 16S rRNA

Bảng 3.7. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn phân lập được từ cá Hồng mỹ xuất huyết dựa trên vùng gen 16S rRNA

TT	Chủng vi khuẩn	Mã số Genbank	Mã số GenBank tham chiếu	Tỷ lệ trong dòng (%)	Địa điểm
1	<i>V. alginolyticus</i> YHTH7	MT953948	MN874162.1	98,06	Thuận An
2	<i>V. alginolyticus</i> YN14	MT953951	MH298564.1	98,05	Thuận An
3	<i>V. alginolyticus</i> YVL22	MT953953	MN843961.1	99,72	Thuận An
4	<i>V. alginolyticus</i> YVL24	MT953954	MN938185.1	99,86	Thuận An
5	<i>V. alginolyticus</i> YVL26	MT953955	CP051109.1	99,59	Thuận An
6	<i>V. alginolyticus</i> YN19	MT953961	MH298564.1	98,05	Thuận An
7	<i>V. alginolyticus</i> YN29	MT953962	MN843961.1	99,72	Thuận An
8	<i>V. alginolyticus</i> YVL31	MT953963	MN938185.1	99,86	Thuận An
9	<i>V. alginolyticus</i> YVL40	MT953964	CP051109.1	99,59	Thuận An
10	<i>V. alginolyticus</i> YVL43	MT953965	MN938360.1	99,65	Thuận An
11	<i>V. alginolyticus</i> YN34	MT953957	MN938360.1	99,65	Thuận An
12	<i>V. alginolyticus</i> YHTH44	MT953967	MN874162.1	98,06	Thuận An
13	<i>V. alginolyticus</i> YN38	MT953974	MH298564.1	98,05	Thuận An
14	<i>V. alginolyticus</i> YVL84	MT953975	MN843961.1	99,72	Thuận An
15	<i>V. alginolyticus</i> YVL85	MT953976	MN938185.1	99,86	Thuận An
16	<i>V. alginolyticus</i> YVL86	MT953977	CP051109.1	99,59	Thuận An
17	<i>V. alginolyticus</i> YHD1	MZ753696	MH298564.1	98,05	Hải Dương
18	<i>V. alginolyticus</i> YHD3	MZ753698	CP051109.1	99,59	Hải Dương
19	<i>V. alginolyticus</i> YHD12	MZ753707	MH298564.1	98,05	Hải Dương

TT	Chủng vi khuẩn	Mã số Genbank	Mã số GenBank tham chiếu	Tỷ lệ tương đồng (%)	Địa điểm
20	<i>V. alginolyticus</i> YHD13	MZ753708	MN938360.1	99,65	Hải Dương
21	<i>V. alginolyticus</i> YHD14	MZ753709	MN938360.1	99,65	Hải Dương
22	<i>V. alginolyticus</i> YHD5	MZ753700	MN843961.1	99,72	Hải Dương
23	<i>V. alginolyticus</i> YHD7	MZ753702	MN938185.1	99,86	Hải Dương
24	<i>V. alginolyticus</i> YHD8	MZ753703	CP051109.1	99,59	Hải Dương
25	<i>V. alginolyticus</i> YHD10	MZ753705	MN938185.1	99,86	Hải Dương
26	<i>V. alginolyticus</i> YHD16	MZ753711	MN843961.1	99,72	Hải Dương
27	<i>V. alginolyticus</i> YHD17	MZ753712	CP051109.1	99,59	Hải Dương
28	<i>V. alginolyticus</i> YHD18	MZ753713	MN938185.1	99,86	Hải Dương
29	<i>V. azureus</i> YVL11	MT953949	KT986135.1	100	Thuận An
30	<i>V. azureus</i> HTH12	MT953950	KT986135.1	100	Thuận An
31	<i>V. azureus</i> YVL5	MT953958	KT986135.1	100	Thuận An
32	<i>V. azureus</i> HTH6	MT953959	KT986135.1	100	Thuận An
33	<i>V. azureus</i> YVL33	MT953971	KT986135.1	100	Thuận An
34	<i>V. azureus</i> YHTH35	MT953972	KT986135.1	100	Thuận An
35	<i>V. azureus</i> YVL45	MT953968	KT986135.1	100	Thuận An
36	<i>V. azureus</i> YVL46	MT953969	KT986135.1	100	Thuận An
37	<i>V. fluvialis</i> YHTH16	MT953952	CP051126.1	100	Thuận An
38	<i>V. fluvialis</i> YHTH18	MT953960	CP051126.1	100	Thuận An
39	<i>V. fluvialis</i> YHTH47	MT953970	CP051126.1	100	Thuận An
40	<i>V. fluvialis</i> YHTH37	MT953973	CP051126.1	100	Thuận An
41	<i>V. fluvialis</i> YHD4	MZ753699	CP051126.1	100	Hải Dương
42	<i>V. fluvialis</i> YHD6	MZ753701	CP051126.1	100	Hải Dương
43	<i>V. fluvialis</i> YHD9	MZ753704	CP051126.1	100	Hải Dương
44	<i>V. orientalis</i> YVL27	MT953956	MN945276.1	100	Thuận An
45	<i>V. orientalis</i> YVL42	MT953966	MN945276.1	100	Thuận An
46	<i>V. orientalis</i> YHD2	MZ753697	MN945276.1	100	Hải Dương
47	<i>V. orientalis</i> YHD11	MZ753706	MN945276.1	100	Hải Dương
48	<i>V. orientalis</i> YHD15	MZ753710	MN945276.1	100	Hải Dương

Kết quả định danh 48 chủng vi khuẩn phân lập được từ cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết tại Thừa Thiên Huế, cho thấy 48 chủng vi khuẩn đều thuộc chi *Vibrio* gồm 4 loài: *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. fluvialis*, *V. orientalis*.

3.2.3. Phân tích đa dạng di truyền

Bảng 3.9. Đa dạng di truyền của các chủng *Vibrio* phân lập được dựa trên vùng gen 16S rRNA

Quần thể	N	S	Eta	H	Hd	K	Pi ($\times 10^{-3}$)
THUẬN AN	30	98	98	9	$0,87 \pm 0,032$	26,331	$18,360 \pm 2,820$
HẢI DƯƠNG	18	84	84	7	$0,902 \pm 0,031$	25,118	$18,240 \pm 3,490$
TỔNG	48	94	94	9	$0,897 \pm 0,013$	24,794	$18,010 \pm 2,170$

Ghi chú: Số mẫu trong một quần thể (n); Số lượng vị trí đa hình (S); Tổng số vị trí đột biến (Eta); Số haplotype (h); Đa dạng haplotype trên gen (Hd); Đa dạng nucleotide trên mỗi vị trí (Pi); Số lượng nucleotide khác biệt trung bình (k); Tất cả các chỉ số đều được xử lý với ý nghĩa thống kê $p < 0,05$.

3.3. Đặc điểm sinh học của các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập được

3.3.1. Đặc điểm hình thái khuẩn lạc và sinh hóa của các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập được

Bảng 3.10-3.13. Đặc điểm sinh hóa của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. fluvialis*, *V. orientalis*, phân lập được từ cá Hồng mỹ bị bệnh

TT	Chỉ tiêu	<i>V. alginolyticus</i> n=28	<i>V. azureus</i> n=8	<i>V. fluvialis</i> n=7	<i>V. orientalis</i> n=5
1	Nhuộm Gram	-	-	-	-
2	Hình thái	Dấu phẩy	Que	Que	Que
3	Khuẩn lạc trên TCBS	Vàng	Xanh	Vàng	Xanh
4	Khuẩn lạc trên TSA	Trắng sữa	Trắng sữa	Trắng sữa	Trắng sữa
	Phát triển ở NaCl 0%	-	-	-	-
	1%	+	+	+	+
5	6%	+	+	+	+
	8%	+(25/28)	-	-	+
	10%	-/+	-	-	-
6	API 20E	414725	0245004	3246126	4066106
7	Oxidase	+	+	+	+

TT	Chỉ tiêu	<i>V. alginolyticus</i> n=28	<i>V. azureus</i> n=8	<i>V. fluvialis</i> n=7	<i>V. orientalis</i> n=5
8	Catalase	+	+	+	+
9	Sinh H ₂ S	-(24/25)	-	-	-
10	Phân giải NO ₃	+	-	+	+
11	Indol	-	+	+	+
12	Voges- Proskauer	+	-	-	-
13	Sử dụng Citrate	+	-	+	-
14	Glucose	+	+	+	-
15	Mannitol	+	-	+	+
16	Sorbitol	+	-	-	-
17	Sucrose	+	-	+	-
18	Arabinose	-	-	+	+

Kết quả nghiên cứu đặc điểm hình thái, sinh lý, sinh hóa của các chủng *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. fluvialis*, *V. orientalis* phân lập được trên cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết nuôi tại Thừa Thiên Huế khá đồng nhất khi so sánh với các chủng do Buller (2004) phân lập

3.3.2. Kết quả xác định hiện diện gen độc của các chủng vi khuẩn phân lập được

Trong nghiên cứu này đã tìm thấy được 39/48 chủng *Vibrio* có chứa ít nhất 1 gen độc tố. Trong số vi khuẩn đó có đến 6/30 chủng vi khuẩn *Vibrio* có chứa 3 gen độc tố. Tuy nhiên, không có chủng vi khuẩn *Vibrio* nào mang đồng thời cả 4 gen độc tố. Trong số 4 gen độc tố (*toxR*, *tdh*, *trh* và *tlh*) được tìm thấy từ *Vibrio* spp. gây bệnh xuất huyết ở cá Hồng mỹ nuôi lồng ở Thừa Thiên Huế, gen độc tố xuất hiện nhiều nhất là gen *tlh* gồm có 29/48 chủng, gen *toxR* được phát hiện trong 22 chủng phân lập được (22/48), gen *trh* là 13/48 chủng phân lập, thấp nhất là gen *tdh* chỉ phát hiện ở 3/48 chủng phân lập được

3.3.3. Kết quả nghiên cứu độc lực của vi khuẩn *Vibrio* trên cá Hồng mỹ

3.3.3.1. Kết quả xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập trên cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết

Bảng 3.16. Kết quả xác định độc lực của các chủng vi khuẩn *Vibrio* phân lập trên cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết

TT	Chủng	Số lượng chủng	Tổng số chủng làm cá chết
1	<i>V. alginolyticus</i>	28	23/28
2	<i>V. azureus</i>	8	0
3	<i>V. fluvialis</i>	7	0
4	<i>V. orientalis</i>	5	0

3.3.3.2. Kết quả xác định độc lực các chủng *V. alginolyticus* phân lập trên cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết

* **Kết quả xác định độc lực các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus***

Có 4 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* YVL22, *V. alginolyticus* YVL24, *V. alginolyticus* YHTH44, *V. alginolyticus* YHD7 gây chết cá đạt tỷ lệ 100% trong 3 ngày đầu thí nghiệm, do đó 4 chủng này được sử dụng cho nghiên cứu tiếp theo để khảo sát các yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*

* Kết quả khảo sát các yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* phân lập được trong điều kiện *in vitro*

Bảng 3.18. Một số yếu tố độc lực của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* phân lập được trong điều kiện *in vitro*

TT	Chủng	Mang gen độc tố	Đường kính vùng hoạt động (mm) (giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn)		
			Caseinase	Di động	Tan huyết trên máu thạch cừu
1	YHD7	<i>ToxR, tdh, tlh</i>	27,8 ^c ± 0,25	50,7 ^c ± 0,58	16,8 ^c ± 0,10
2	YVL24	<i>ToxR, tdh, tlh</i>	27,7 ^c ± 0,29	50,2 ^c ± 0,29	16,7 ^c ± 0,10
3	YVL22	<i>ToxR, trh, tlh</i>	27,2 ^b ± 0,29	46,2 ^b ± 0,25	15,5 ^b ± 0,15
4	YHTH44	<i>ToxR, trh, tlh</i>	27,2 ^b ± 0,21	45,9 ^b ± 0,12	15,5 ^b ± 0,06
5	YHD3	-	21,2 ^a ± 0,25	32,7 ^a ± 0,58	12,7 ^a ± 0,25

3.3.4. Đặc điểm bệnh học của cá được cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* và liều gây chết 50% (LD50)

3.3.4.1. Dấu hiệu bệnh lý

Kết quả cảm nhiễm cho thấy tất cả cá bệnh ở các nghiệm thức tiêm 4 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* đều có hiện tượng bơi lơ dờ

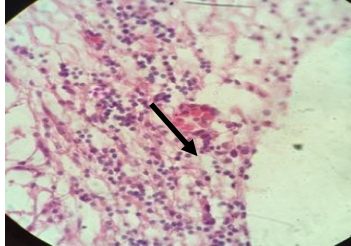
kèm theo dấu hiệu xuất hiện các vết đỏ, xuất huyết trên cơ thể cá. Đặc biệt, khi giải phẫu các cơ quan nội quan như gan có hiện tượng xuất huyết, xoang bụng tích dịch và có mùi hôi.

3.3.4.2. Độc lực và khả năng gây bệnh của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*

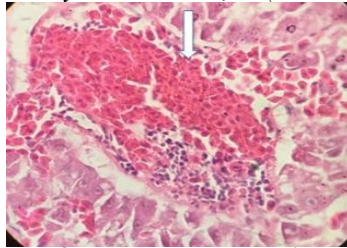
Kết quả thí nghiệm xác định LD₅₀ của 4 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* (YHD7, YVL24, YVL22 và YHTH44) trên cá Hồng mỹ lần lượt là: $6,5 \times 10^5$; $8,1 \times 10^5$; $1,7 \times 10^6$; và $1,9 \times 10^6$ CFU/mL.

3.3.5. Đặc điểm mô bệnh học của cá cảm nhiễm *V. alginolyticus*

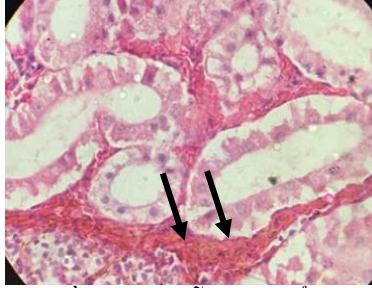
Kết quả nghiên cứu mô học cá Hồng mỹ cảm nhiễm *V. alginolyticus* trong điều kiện thực nghiệm cho thấy vi khuẩn *V. alginolyticus* gây biến đổi cấu trúc mô của da, gan, thận, lách và não cá. *V. alginolyticus* gây xuất huyết trên các mô của da, gan, thận, lách và não cá



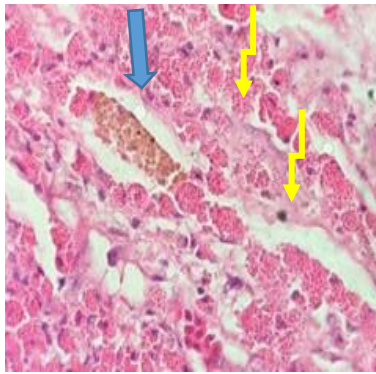
Hình 3.18. Mô não cá Hồng mỹ nhiễm vi khuẩn *V. alginolyticus* (100X), xuất huyết ở não cá bệnh (mũi tên)



Hình 3.19. Mô gan cá Hồng mỹ nhiễm vi khuẩn *V. alginolyticus* (100X), xuất hiện nhiều tế bào máu và không bào (mũi tên).



Hình 3.20. Mô thận cá Hồng mỹ nhiễm vi khuẩn *V. alginolyticus* (100X)

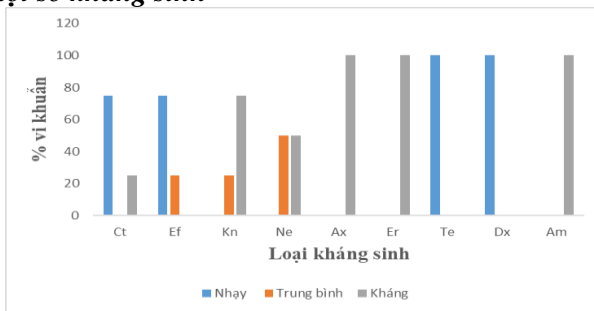


Hình 3.21. Mô lách cá Hồng mỹ nhiễm vi khuẩn *V. alginolyticus* (100X).

Mô lách cá bệnh xuất hiện những vùng bị hoại tử (mũi tên vàng).

Trung tâm đại thực bào melanine (mũi tên xanh).

3.3.6. Đánh giá mức độ mẫn cảm của các chủng *V. alginolyticus* đối với một số kháng sinh



Hình 3.23. Tỷ lệ (%) các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* kháng, trung bình, nhạy với các loại kháng sinh

Kết quả đánh giá mức độ mẫn cảm của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* đối với 9 loại kháng sinh (Hình 3.23) cho thấy vi khuẩn đã kháng hoàn toàn với các loại kháng sinh như Ampicillin, Amoxicillin, Erythromycin chiếm tỷ lệ 100% và các kháng sinh như Kanamycin (75%) và Neomycin (50%). Bên cạnh đó cũng thấy rằng, vi khuẩn *V. alginolyticus* có tính mẫn cảm với các loại kháng sinh, lần lượt là: Tetracycline (100%), Doxycycline (100%), Cefotaxime (75%) và Enrofloxacin (75%).

3.4. Kết quả nghiên cứu sử dụng cao chiết cây Diệp hạ châu trong phòng và điều trị bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Vibrio* ở cá Hồng mỹ

3.4.4. Hiệu quả kháng vi khuẩn *V. alginolyticus* của cao chiết Diệp hạ châu

3.4.4.1. Hoạt tính kháng các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* của cao chiết Diệp hạ châu

Bảng 3.22. Đường kính vòng kháng vi khuẩn *V. alginolyticus* của cao chiết Diệp hạ châu

Nồng độ mg/mL	<i>V. alginolyticus</i>			
	YHD7	YVL24	YVL22	YHTH44
100	10,3 ^a ±0,29	10,4 ^a ± 0,12	11,3 ^a ± 0,25	11,3 ^a ± 0,15
200	12,2 ^b ±0,29	12,3 ^b ± 0,17	14,6 ^b ± 0,17	14,4 ^b ± 0,12
300	14,7 ^c ± 0,15	15,8 ^c ± 0,25	17,2 ^c ± 0,15	17,1 ^c ± 0,17
400	17,1 ^d ±0,51	17,4 ^d ± 0,12	18,3 ^e ± 0,17	18,2 ^e ± 0,25
500	18,1 ^e ±0,12	18,3 ^e ± 0,25	19,1 ^f ± 0,21	19,1 ^f ± 0,12
Te (30ug)	16,8 ^d ±0,15	17,2 ^d ± 0,15	17,8 ^d ± 0,25	17,8 ^d ± 0,12
ĐC (-)	0	0	0	0

Như vậy, có thể thấy cao chiết Diệp hạ châu trong dung môi Ethanol ở các nồng độ 100 – 500 mg/mL đều có khả năng kháng vi khuẩn *V. alginolyticus*, cao nhất ở nồng độ 500 mg/mL với đường kính vòng kháng lớn nhất ($p < 0,05$)

3.4.4.2. Xác định nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết cây Diệp hạ châu lên các chủng vi khuẩn thử nghiệm

Bảng 3.23. Nồng độ ức chế tối thiểu và nồng độ tiêu diệt tối thiểu của cao chiết cây Diệp hạ châu lên các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*

Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn (CFU/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MBC/MIC
YVL24	10 ⁶	25	50	2
YHD7		25	50	2
YVL22		25	50	2
YHTH44		12,5	25	2

Tỷ lệ MBC/MIC ≤ 4 cho thấy cao chiết có khả năng tiêu diệt vi khuẩn. Điều này cho thấy cao chiết cây Diệp hạ châu có khả năng tiêu diệt cả năm chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ

3.4.4.3. Đánh giá ngưỡng an toàn của cao chiết cây Diệp hạ châu lên cá Hồng mỹ

Tỷ lệ sống của cá ở các nghiệm thức thí nghiệm đều đạt 100%; do đó, không xác định được giá trị LC₅₀ của cao chiết cây Diệp hạ châu. Kết quả này cho thấy sử dụng cao chiết cây Diệp hạ châu là an toàn cho cá Hồng mỹ.

3.4.5. Ảnh hưởng của cao chiết Diệp hạ châu đến chỉ tiêu số lượng tế bào máu của cá Hồng mỹ

3.4.5.1. Kết quả xác định các chỉ tiêu huyết học của cá Hồng mỹ

Mật độ hồng cầu

Bảng 3.25. Mật độ hồng cầu ($\times 10^6$ tb/mm³)

Nghiệm thức	Ngày 4	Ngày 7	Ngày 10	Ngày 14
NT1	2,19 ^a ± 0,11	2,61 ^b ± 0,13	2,86 ^b ± 0,12	2,75 ^b ± 0,12
NT2	2,22 ^a ± 0,13	2,64 ^b ± 0,14	2,88 ^b ± 0,15	2,78 ^b ± 0,14
NT3	2,30 ^a ± 0,14	2,69 ^b ± 0,16	2,92 ^b ± 0,22	2,81 ^b ± 0,19
NT4	2,15 ^a ± 0,11	2,04 ^a ± 0,11	2,20 ^a ± 0,14	2,28 ^a ± 0,12
NT5	2,13 ^a ± 0,12	2,15 ^a ± 0,12	2,36 ^a ± 0,11	2,74 ^b ± 0,13

Ghi chú: các giá trị trên là Mean ± SE, các giá trị có ký tự ^{a, b, c} khác nhau trên cùng một cột sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Trong đó: NT1 (bổ sung 5% cao chiết, tiêm vi khuẩn); NT2 (bổ sung 6% cao chiết, tiêm vi khuẩn); NT3 (bổ sung 7% cao chiết, tiêm vi khuẩn); NT4 (tiêm vi khuẩn, không bổ sung cao chiết); NT5 (tiêm nước muối sinh lý, không bổ sung cao chiết).

Mật độ tổng bạch cầu

Bảng 3.26. Mật độ tổng bạch cầu ($\times 10^5$ tb/mm³)

Nghiệm thức	Ngày thứ 4	Ngày 7	Ngày 10	Ngày 14
NT1	2,12 ^a ± 0,13	3,05 ^c ± 0,14	3,21 ^c ± 0,16	3,18 ^b ± 0,23
NT2	2,18 ^a ± 0,19	3,09 ^c ± 0,15	3,30 ^c ± 0,12	3,27 ^b ± 0,17
NT3	2,30 ^a ± 0,15	3,15 ^c ± 0,23	3,39 ^c ± 0,18	3,33 ^b ± 0,25
NT4	1,95 ^a ± 0,11	2,51 ^b ± 0,15	2,62 ^b ± 0,13	2,86 ^b ± 0,11
NT5	1,93 ^a ± 0,16	1,95 ^a ± 0,17	2,10 ^a ± 0,16	2,23 ^a ± 0,18

3.4.5.2. Tỷ lệ sống của cá Hồng mỹ

Bảng 3.27. Tỷ lệ sống (%) của cá Hồng mỹ ở các thí nghiệm

TT	Nghiệm thức	Tỷ lệ sống (%)
1	NT1	70,00 ^b ± 5,77
2	NT2	73,33 ^b ± 3,33
3	NT3	83,33 ^{bc} ± 6,67
4	NT4	36,67 ^a ± 3,33
5	NT5	96,67 ^c ± 3,33

Cá Hồng mỹ cho ăn thức ăn có bổ sung cao chiết Diệp hạ châu có số lượng hồng cầu, tổng bạch cầu tăng. Tỷ lệ sống của cá Hồng mỹ ở các nghiệm thức phòng bệnh xuất huyết dao động 36,67-96,67%. Như vậy, với kết quả thử nghiệm thành công trong thí nghiệm đã xác định được cao chiết Diệp hạ châu bổ sung và thức ăn cho cá Hồng mỹ ăn đã phòng bệnh xuất huyết xảy ra trên cá Hồng mỹ trong điều kiện phòng thí nghiệm.

3.4.6. Kết quả thí nghiệm điều trị bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ bằng cao chiết Diệp hạ châu

Bảng 3.28. Tỷ lệ sống (%) của cá Hồng mỹ ở các thí nghiệm điều trị

TT	Nghiệm thức	Tỷ lệ sống (%)
3	NT1	63,33 ^b ± 6,67
4	NT2	33,33 ^a ± 3,33
5	NT3	96,67 ^c ± 3,33

Kết quả cho thấy nghiệm thức được cho ăn thức ăn có bổ sung 7% cao chiết Diệp hạ châu có tỷ lệ sống là 63,33%; trong đi đó, nghiệm thức không bổ sung cao chiết Diệp hạ châu vào thức ăn thì tỷ lệ sống chỉ đạt 33,33%. Điều đó, thể hiện hiệu quả của việc sử dụng cao chiết trong việc điều trị bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ trong điều kiện phòng thí nghiệm.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

1. Phân lập và định danh

Tất cả 48 chủng vi khuẩn *Vibrio* từ các mẫu cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết tại Thừa Thiên Huế được phân lập và định danh bao gồm: 28 chủng *V. alginolyticus*, 8 chủng *V. azureus*; 7 chủng *V. fluvialis* và 5 chủng *V. orientalis*. trong nghiên cứu có mức độ tương đồng gen 16S rRNA trên ngân hàng Genbank dao động từ 98,05 đến 100%. Đồng thời, tất cả các trình tự nucleotide của các chủng vi khuẩn đều được đăng ký trên ngân hàng gen thế giới với các mã số tham chiếu.

2. Xác định sự hiện diện của một số gen độc tố từ các chủng vi khuẩn phân lập.

39/48 chủng *Vibrio* có chứa ít nhất 1 gen độc tố. Trong số vi khuẩn đó có đến 6/30 chủng vi khuẩn *Vibrio* có chứa 3 gen độc tố. Tuy nhiên, không có chủng vi khuẩn *Vibrio* nào mang đồng thời cả 4 gen độc tố. Trong số 4 gen độc tố (*toxR*, *tdh*, *trh* và *tlh*) được tìm thấy từ *Vibrio* spp. gây bệnh xuất huyết ở cá Hồng mỹ nuôi lồng ở Thừa Thiên Huế, gen độc tố xuất hiện nhiều nhất là gen *tlh* gồm có 29/48 chủng, gen *toxR* được phát hiện trong 22 chủng phân lập được (22/48), gen *trh* là 13/48 chủng phân lập, thấp nhất là gen *tdh* chỉ phát hiện ở 3/48 chủng phân lập được.

3. Độc lực của các chủng *Vibrio* phân lập được trên cá Hồng mỹ

4 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* YVL22, *V. alginolyticus* YVL24, YHTH44, *V. alginolyticus* YHD7 là tác nhân chính gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ (*S. ocellatus*) nuôi lồng tại Thừa Thiên Huế. Độc lực và liều gây chết LD50 của 4 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* (YHD7, YVL24, YVL22 và YHTH44) lần lượt là: $6,5 \times 10^5$; $8,1 \times 10^5$; $1,7 \times 10^6$; và $1,9 \times 10^6$ CFU/mL. Các dấu hiệu bệnh lý ở cá sau khi gây bệnh thực nghiệm ở nghiên cứu này hoàn toàn giống với các dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của cá Hồng mỹ bị bệnh thu được ngoài tự nhiên.

4. Cao chiết Diệp hạ châu

Ứng dụng cao chiết thảo dược Diệp hạ châu (*P. amarus*) trong thử nghiệm ức chế vi khuẩn *V. alginolyticus*, xác định ngưỡng an toàn của cao chiết Diệp hạ châu đối với cá Hồng mỹ cũng như ảnh hưởng của cao chiết đến các chỉ tiêu huyết học và tỷ lệ sống của cá Hồng mỹ thí nghiệm, hướng đến việc sử dụng thảo dược an toàn trong nuôi trồng thủy sản.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

1. Cá Hồng mỹ nuôi lồng ở Thừa Thiên Huế chủ yếu ở các địa phương như: xã Hải Dương, Thuận An, Vinh Hiền và Lộc Bình. Cá Hồng mỹ bị bệnh thường bắt gặp nhiều nhất là bệnh xuất huyết, lở loét (23/30 hộ, chiếm 76,7%), đỉ cá (chiếm 23,3%), đường ruột (chiếm 16,7%).

2. Nghiên cứu đã phân lập và định danh được 48 chủng vi khuẩn *Vibrio* từ các mẫu cá Hồng mỹ bị bệnh tại Thừa Thiên Huế, bao gồm: 28 chủng *V. alginolyticus*, 8 chủng *V. azureus*; 7 chủng *V. fluvialis* và 5 chủng *V. orientalis*. Cấu trúc gen *16S rRNA* của các chủng vi khuẩn *Vibrio* trong hai quần thể được thu thập tại những địa điểm Thuận An và Hải Dương trên cùng một đối tượng ở cá Hồng mỹ là tương đối ổn định cả về cấu trúc và thành phần loài.

3. Xác định sự hiện diện các gen độc tố của 48 chủng *Vibrio* phân lập từ cá Hồng mỹ bị bệnh xuất huyết, trong đó 39 chủng có chứa ít nhất 1 gen độc tố (bao gồm: 29/39 chủng có mang gen *tlh*, 13/39 chủng có mang gen *trh*, 3/39 chủng có mang gen *tdh*, 22/39 chủng có mang gen *toxR*). Có 16 chủng mang cả 2 gen độc tố (9 chủng mang 2 gen *toxR* và *tlh*; 1 chủng mang 2 gen *toxR* và *tdh*; 1 chủng mang 2 gen *toxR* và *trh*; 4 chủng mang 2 gen *trh* và *tlh*). Ngoài ra có 4 chủng mang cả 3 gen độc tố (*toxR*, *tlh*, *trh*) đó là *V. orientalis* YHD2; *V. orientalis* YVL42; *V. alginolyticus* YVL22, *V. alginolyticus* YHTH44 và 2 chủng mang 3 gen độc tố (*toxR*, *tlh*, *tdh*) đó là *V. alginolyticus* YVL24 và *V. alginolyticus* YHD7.

4. Độc lực và liều gây chết LD_{50} của 4 chủng *V. alginolyticus* YHD7, YVL24, YVL22 và YHTH44, lần lượt là: $6,5 \times 10^5$; $8,1 \times 10^5$; $1,74 \times 10^6$ và $1,9 \times 10^6$ CFU/mL là tác nhân chính gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ. Cá khi gây bệnh thực nghiệm có các dấu hiệu bệnh lý giống với cá nuôi lồng khi thu mẫu: da, vây, mắt xuất huyết, nội quan sưng to. Kết quả nghiên cứu mô bệnh học cá nhiễm *V. alginolyticus* trong điều kiện thực nghiệm với vi khuẩn *V. alginolyticus* có xuất huyết và hoại tử trên các mô gan, thận, lách, não và cơ cá. Bên cạnh đó, 4 chủng vi khuẩn này đều nhạy cảm với các loại kháng sinh như Tetracycline, Doxycycline, Cefotaxime và kháng hoàn toàn với kháng sinh Amoxicillin, Ampicillin, Erythromycin.

6. Cao chiết Diệp hạ châu có khả năng ức chế với 4 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* ở cá Hồng mỹ mắc bệnh xuất huyết lở loét với nồng độ ức chế tối thiểu có giá trị từ 6,25 đến 25 mg/mL và nồng độ tiêu diệt tối thiểu từ 25 đến 50 mg/mL.

7. Cá Hồng mỹ cho ăn thức ăn có bổ sung cao chiết Diệp hạ châu có số lượng hồng cầu, tổng bạch cầu tăng. Tỷ lệ sống của cá Hồng mỹ ở các nghiệm thức phòng bệnh xuất huyết dao động 36,67-96,67%. Đối với Tỷ lệ sống của cá Hồng mỹ ở các nghiệm thức điều trị bệnh xuất huyết bổ sung 7% cao chiết Diệp hạ châu vào thức ăn và cho cá ăn khi có dấu hiệu lâm sàng thì tỷ lệ sống đạt 63,33% cao hơn so với nghiệm thức cá bị bệnh và không bổ sung cao chiết Diệp hạ châu vào thức ăn chỉ đạt tỷ lệ sống 33,33%.

4.2. Kiến nghị

1. Nghiên cứu sâu hơn về độc tố và các gen quy định độc tố gây bệnh của vi khuẩn *V. alginolyticus* đối với cá Hồng mỹ

2. Nghiên cứu các giải pháp tổng hợp trong phòng và trị bệnh xuất huyết ở nuôi cá biển để tăng nhanh nghề nuôi cá biển tại Việt Nam và ứng dụng chế phẩm Diệp hạ châu hướng chuyên giao cho sản xuất.

**DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN
ĐẾN LUẬN ÁN**

TT	Tên bài báo	Tạp chí, số	Tác giả	Xếp hạng
1	The indentification and determination of toxin genes of <i>Vibrio</i> strains caused hemorrhagic disease on red drum (<i>Sciaenops ocellatus</i>) using PCR	AMB Express (2191-0855), 11(4), 2021, 1-8 https://doi.org/10.1186/s13568-020-01161-w	Phạm Thị Hai Yên , Nguyen Quang Linh, Nguyen Duy Quynh Tram	Danh mục SCIE/Q2
2	Xác định khả năng kháng khuẩn của cao chiết diệp hạ châu (<i>Phyllanthus amarus</i>) đối với vi khuẩn <i>Vibrio alginolyticus</i> gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ (<i>Sciaenops ocellatus</i>)	Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Kỹ thuật và Công nghệ, tập 130 (2A), 2021 https://doi.org/10.26459/hueunijtt.v130i2A	Phạm Thị Hải Yến , Nguyễn Duy Quỳnh Trâm Nguyễn Quang Linh, Nguyễn Anh Hiếu	Danh mục Hội đồng chức danh giáo sư nhà nước
3	Isolation and determination of <i>Vibrio</i> spp. pathogen from <i>Sciaenops ocellatus</i> suffering from hemorrhagic disease under cage culture in Vietnam	Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences; vol 10(II), April, 2022, http://dx.doi.org/10.18006/2022.10(2).405.415	Phạm Thị Hai Yên , Nguyen Duy Quynh Tram, Nguyen Quang Linh	Danh mục Scopus (Q4)
4	Hiện trạng nuôi cá lồng và tình hình xuất hiện bệnh trên một số đối tượng cá nước lợ - mặn có giá trị kinh tế nuôi tại Thừa Thiên - Huế	Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, 374:50-57, 2019 http://tapchikhoahocnongnghiep.vn/Pages/tap-chi-nong-nghiep-va-phat-trien-nong-thon-so-23-2019.aspx	Phạm Thị Hải Yến , Trần Quang Khánh Vân, Nguyễn Khoa Huy Sơn, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm	Danh mục Hội đồng chức danh giáo sư nhà nước

HUE UNIVERSITY
UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY

PHAM THI HAI YEN

**STUDY OF VIBRIO BACTERIA CAUSING HEMORRHAGIC
DISEASE IN RED DRUM *Sciaenops ocellatus* (LINNAEUS,
1766) AND TRIAL OF PREVENTION, TREATMENT BY
HERBAL PLANT (*Phyllanthus amarus*)**

SUMMARY OF DOCTERAL THESIS

THUA THIEN HUE - 2022

HUE UNIVERSITY
UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY

PHAM THI HAI YEN

**STUDY OF VIBRIO BACTERIA CAUSING HEMORRHAGIC
DISEASE IN RED DRUM *Sciaenops ocellatus* (LINNAEUS,
1766) AND TRIAL OF PREVENTION, TREATMENT BY
HERBAL PLANT (*Phyllanthus amarus*)**

SUMMARY OF DOCTERAL THESIS

Major: Aquaculture
Major code: 9620301

Science instructor:

1. Assoc. Prof. Ph.D. Nguyen Quang Linh
2. Assoc. Prof. Ph.D Nguyen Duy Quynh Tram

THUA THIEN HUE - 2022

INTRODUCTION

1. Reason to choose the topic

The Red drum had scientific name *Sciaenops ocellatus*, is a species of marine fish in the family Sciaenidae. In the wild, they are distributed mainly in the Gulf of Mexico and the southwestern coast of the United States, are well-adapted species, they can live in freshwater, brackish and saltwater environments even, but they are most suitable for brackish water and salt water. Red drum is a species had fast growth rate. Recently, they is gradually becoming a popular cultured species in Vietnam, and this is also one of the main marine fish species that have been and are being raised mainly in Thua Thien Hue province, Vietnam. At the same time, this is also one of the species and objects prioritized for research, selection and breeding in order to develop marine aquaculture into a large-scale and industrial commodity production industry in line with the strategy of marine culture development to 2030 and vision to 2045.

However, *Vibrio* disease causing great losses in Red drum is one of the main challenges for the development of cage fish farming in Thua Thien Hue, Vietnam.

In the process of fish raising commercial, in order to limit damage caused by *Vibrio* diseases, farmers often apply many different measures to prevent and treat for fish, in which antibiotics are commonly used to treat bacteria diseases, especially *Vibrio*, caused by aquatic animals.

However, before the situation of overuse of antibiotics in aquaculture has caused the phenomenon of drug resistance of pathogenic bacteria, causing residues in products, the environment and affecting human health. Research on extracting biologically active substances from herbal plants has become one of the new approaches to replace the current use of antibiotics. Stonebreaker (*Phyllanthus amarus*) is a popular herb that grows in Vietnam, especially in the central provinces of Vietnam. A number of studies using medicinal herbs for aquatic animals have shown that alkanoid and flavonoid compounds present in plant have high antibacterial ability. This is a basic on both theoretical and practical, we have chosen the title of the project: **Study of *Vibrio* bacteria causing hemorrhagic disease in Red drum *Sciaenops ocellatus* (Linnaeus, 1766) and trial of prevention, treatment by herbal plant**

(*Phyllanthus amarus*) to provide data on diseases caused by *Vibrio* bacteria in fish and to testing the herbal plant extract to contribute to disease control in fish in particular and in marine fish in general more and more effectively.

2. The objective of the study

Studying the bacteria is main pathogen causing hemorrhagic disease in Red drum fish and the solution to prevent and treat hemorrhagic disease in fish (*Sciaenops ocellatus*) by herbal plant to improve the efficiency of marine fish farming, thereby serving as a basis for production export fish.

3. Scientific of the study

The results of the thesis have provided scientific data on *Vibrio* strains carrying toxic genes that cause hemorrhagic disease in caged fish in Thua Thien Hue, Vietnam, applying herbal plant extract to inhibit bacterial growth. *Vibrio* bacteria and reduce the harmful effects of the disease.

4. New findings

We determined the presence of 48 *Vibrio* strains, of which 39 *Vibrio* strains carried at least one of the virulence genes (*trh*, *tdh*, *toxR* and *tlh*) and 9 *Vibrio* strains did not have the above virulent genes. All of 48 16S *rRNA* genes have published on the world gene bank (Genbank).

It was determined that *Vibrio* causing hemorrhagic disease in cage-cultured *S. ocellatus*, that was *V. alginolyticus*, which is the main agent simultaneously carrying 3 toxin genes (*tdh*, *toxR* and *tlh*) or (*trh*, *toxR* and *tlh*).

It was determined of biochemical and pathological characteristics of *Vibrio* bacteria causing hemorrhagic disease in *S. ocellatus* fish. At the same time, the sensitivity of bacteria to some common antibiotics in aquaculture was also investigated.

Applied of herbal extract (*P. amarus*) against *V. alginolyticus* strains in prevent and treatment hemorrhagic on fish disease.

CHAPTER 1. LITERATURE REVIEW

1.1. Overview of red snapper and haemorrhagic disease in red snapper

Red drum was widely distributed in the Gulf of Mexico and the southwestern coast of the United States. With the development of increasingly high aquaculture technology, the commercial farming of has become an object of interest and popular culture around the world. Red drum has been introduced to Vietnam since 1999, is a brackish saltwater fish with economic value, easy to raise, delicious meat, and high nutritional content. Research results of Dang Thanh Long et al (2019), isolated and identified a strain of *V. parahaemolyticus*-01 causing hemorrhagic disease in red drum culture in Thua Thien Hue and cloned thermolabile hemolysin gene (*tlh*) encodes for the thermostable toxin antigen *tlh* 1257 bp in size.

Research results isolation of *Vibrio* strains causing haemorrhagic disease in cage red drum cage culture in Hai Duong have identified the presence of *V. vulnificus*; *V. brasiliensis*; *V. cholerae* and *V. parahaemolyticus* only carried one *tlh* toxin gene, of which *V. vulnificus* had the highest frequency of 42.86%.

1.2. Application of *Phyllanthus amarus* extracts in the prevention and treatment of diseases on aquatic animals

Alkaloids and flavonoids are two compounds with high antibacterial ability in *Phyllanthus amarus* extracts

Derived from the effects of plant *Phyllanthus amarus* extracts on liver disease, researchers have conducted trials using extracts from Diep Ha Chau to prevent diseases for farmed shrimp. Some farming households have used Diep Ha Chau to boil concentrated water and mix it with shrimp food to prevent diseases and enhance resistance.

In addition, the *Phyllanthus amarus* extracts extract also significantly increased the survival, growth and concentration of biochemical components of giant freshwater shrimp (*Macrobrachium rosenbergii*) when fed with artemia larvae enriched with this extract. Research results of Tran Vinh Phuong et al. (2019), determined the antibacterial activity and minimum inhibitory concentration of *Phyllanthus amarus* extracts against *V. parahaemolyticus* and *Vibrio* sp. causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in white leg shrimp (*L. vannamei*) cultured in Thua Thien Hue.

CHAPTER 2. OBJECT, MATERIALS AND METHODOLOGY

2.1. Subject and scope of the study

- Sampling location: Fish were collected from cage farming households in Hai Duong commune and Thuan An township, Hue city, Thua Thien Hue province.

- Objects: *Vibrio* bacteria was isolated from Red drum (*S. ocellatus*) haemorrhagic disease under cage in Thua Thien Hue, and Stonebreaker (*P. amarus*) was collected in Thua Thien Hue, Vietnam.

- The study period runs from 2018 to 2022

- Research sites:

+ University of Agriculture and Forestry, Hue University

+ Institute of Biotechnology, Hue University

2.2. Research content

- Survey on farming situation and disease on Red drum cage culture in Thua Thien Hue;

- Isolation and identification of *Vibrio* strains causing hemorrhagic disease in fish;

- Research on some biological characteristics of isolated strains of *Vibrio*;

- Research on using extracts of *Phyllanthus amarus* in the prevention and treatment of hemorrhagic disease caused by *Vibrio* bacteria in fish.

2.3. Research methodology

2.3.1. Survey

The study was conducted through the survey of cage fish farming households in Hai Duong commune (in Huong Tra town, now in Hue city), Loc Binh and Vinh Hien communes (Phu Loc district) and Thuan An township (Phu Vang district, now in Hue city) Thua Thien Hue province since April 2018. There are 30 votes in total.

2.3.2. Isolation and identification *Vibrio* strains

2.3.2.1. Collection

A total of 62 cage-raised fish samples with clinical manifestations of haemorrhagic disease were collected from 15 households in 2 locations, including: 35 fish samples in Thuan An and 27 fish samples in Hai Duong, Hue city, Thua Thien Hue province, Vietnam. Diseased fish had sizes from 12.2 to 37.5 cm in length and 24.20 to 591.00 g in weight. After collection, fish were kept alive in styrofoam and transported to the laboratory for bacterial isolation.

Table 2.2. *Number of fish disease*

Location	Period	Time	Number of fish	Length (cm) (M±SD)	Weight (g) (M±SD)
Thuan An	1	June 2019	11	24.8 ± 0.6	188.6 ± 9.2
	2	Aut, 2019	24	37.5 ± 1.1	591.0 ± 10.2
Hai F	3	Jan, 2020	10	14.24 ± 1.1	25.77 ± 1.4
	4	Mar, 2020	17	12.2 ± 1.1	24.20 ± 1.5

2.3.2.2. Culture and isolation of *Vibrio*

The fish were washed thoroughly under tap water and dried. The outer surface of the fish was disinfected with 70% ethanol, and the fish was opened with a sterilized scalpel. The internal pathological signs were recorded and the damaged tissues from the brain, liver, kidney, and spleen were separated with sterilized culture rods. Extract sticks on the culture rod were inoculated on the thiosulfate citrate bile salts sucrose medium (TCBS, Himedia, India) and cultured at 28°C for 24 hours. The prevalent and loose colonies were further cultured in the TCBS medium under the same conditions for total DNA extraction.

2.3.2.3. Molecular identification of *Vibrio*

The *Vibriocell* lines isolated from Red drum fish with hemorrhagic signs were grown proliferatively on the trypto-casein soy broth (TSB) supplemented with 2% NaCl and shaken at 180 rpm at 30°C for 24 hours. Cell biomass was obtained by centrifugation at 8,000 rpm/min for 2 min at 4 °C. The total DNA of *Vibriocell* lines was extracted by the modified phenol/chloroform method with some modification and the

bacterial cells were directly extracted with phenol SDS/lysozyme or proteinase K (Neumann et al. 1992). Frank và cs (2008) là 27F: AGAGTTTGATCMTGGCTCAG và 1492R: TACGGYTACCTTGTTACGACTT

PCR products of the *16S rRNA* gene region after purification were used for direct sequencing by Sanger method on the ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) system at Maccrogen Company, Korea. (dna.macrogen.com).

2.3.2.4. Genetic diversity analysis

Phylogenetic tree showing genetic relationships was built using MEGA X (Molecular Evolution Genetic Analysis) software, based on UPGMA method.

2.3.3. Physiological and Biochemical characterization

2.3.3.1. Determination of some colony morphological, cellular and biochemical characteristics of *Vibrio* strains:

- Determination of some basic colony morphological, physiological and biochemical characteristics was done according to Buller's method (2004).

- The biochemical characteristics of the isolates were also investigated using the API 20E (Analytical profile index) kit (Bio-Mérieux, France).

2.3.3.2. PCR method detects some toxic genes of isolated *Vibrio* strains

The presence of toxin genes *tth*, *tdh*, *trh* and *toxR* in *Vibrio* strains according to the method of Luan et al (2007); Marlina et al (2007)

2.3.3.3. Method of determining the virulence of *Vibrio* strains isolated on fish

Methods for investigating virulence factors of *Vibrio* bacteria *in vitro*:

Bacterial motility, production capacity of caseinase enzymes, haemolysin were performed according to the method of Natrah et al (2011).

2.3.3.4. LD₅₀ - Lethal dose 50

Experimental fish: The experimental juvenile fish had an average length of 11.7 cm fish⁻¹ average weight reached 15.6 g fish⁻¹.

Preparation of bacteria:

Vibrio bacterial strains were grown proliferatively in TSB medium (TSB, Merck, Germany) supplemented with 2% NaCl,

cultured at 28°C for 24 hours in a culture cabinet with shaking speed of 150 rpm.

Procedure: 4 strains of *V. alginolyticus* bacteria that caused 100% mortality in 3 days were selected to determine the lethal dose of LD₅₀. The experiment to determine the LD₅₀ value was arranged with 5 treatments including: 4 experimental treatments (fish in each treatment were injected with 0.1mL of bacterial suspension at the bacterial density of *V. alginolyticus* from 10⁵ to 10⁸ CFU mL⁻¹) and one control treatment (fish were injected with 0.1 mL of physiological saline (0.85% NaCl)). Survival rate was monitored for 14 days. The LD₅₀ value was determined according to the method of Reed and Muench (1938).

2.3.3.5. *Determination of histopathological characteristics*

Histopathological analysis according to the method of Mohamed (2009).

2.3.3.6. *Antibiotic susceptibility test*

The antibiotic susceptibility of bacteria was tested by diffusion on agar plates according to the method of Bauer et al (1966).

2.3.4. Study on the use of herbal plant extract in the prevention and treatment of hemorrhagic disease caused by *Vibrio spp.* in fish

2.3.4.3. *Determination of antibacterial activity of herbal plant extract*

Antibacterial activity:

The antibacterial activity of the extract of plant was performed by the method of agar plate diffusion on Mueller Hinton Agar (MHA, Himedia, India).

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and Minimum bactericidal concentration (MBC)

From the experiment to test the antibacterial activity of the extract, the concentration of the extract with the smallest antibacterial ring will be used for the experiment to determine the minimum inhibitory concentration and the minimum bactericidal concentration on 96-well plastic plates with different concentrations of extracts with 0.01% resazurin.

Determining the safety threshold of plant extract on experimental fish:

From the MBC value (determined above), the experiment determined the safety threshold of plant extract on fish was arranged

by mixing the extract into INVE feed with the corresponding concentrations during the experiment period of 14 days.

2.3.4.4. Methods to evaluate the effectiveness of haemorrhagic disease fish of plant extract

Experiment on the effect of plant extract on blood cell count of fish

Table 2.8. *Experimental design to determine the effect of plant extract on hematological parameters*

Experiment	Number of fish	Feed		<i>V. alginolyticus</i> YHD7
		Commercial	Plant extracts (%)	
NT1	15	+	5	6.5×10^5 CFU mL ⁻¹
NT2	15	+	6	6.5×10^5 CFU mL ⁻¹
NT3	15	+	7	6.5×10^5 CFU mL ⁻¹
NT4	15	+	0	6.5×10^5 CFU mL ⁻¹
NT5	15	+	0	No infection, inject physiological saline

On the third day, started feeding plant extract for the treatments with the extract added to the feed. On the 4th day, infection with *V. alginolyticus* YHD7 strain was started with LD₅₀ = 6.5×10^5 CFU mL⁻¹. Conduct blood collection in fish caudal artery on experimental days 4; 7; 10 and 14 (3 fish/tank each time) to determine the number of blood cells. Monitor and evaluate the survival rate in 14 days of the experiment.

Methods for determining hematological criteria:

The number of red blood cells was determined according to the method of Natt and Herrick (1952).

Total white blood cell type was determined according to the method of Hrubec et al (2000).

Survival rate

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{Final number of fish}}{\text{Initial number of fish}} * 100$$

The effectiveness of using plant extract as supplement in feed was assessed by the relative percentage of survival (RPS) (%) (Ellis, 1988)

2.3.4.5. *Experimental effect of plant extract on the treatment of diseases*

Based on the experimental basis of disease prevention for fish by plant extracts. There are 3 treatments with 3 replication including:

NT1: adding 7% plant extract to food, infecting bacteria *V. alginolyticus* YHD7, $LD_{50} = 6.5 \times 10^5$ CFU mL⁻¹

NT2: do not add the extract to feed, infect bacteria *V. alginolyticus* YHD7, $LD_{50} = 6.5 \times 10^5$ CFU mL⁻¹

NT3: Do not add the extract to food, inject physiological saline

The experiment was conducted during 14 days. Infect on day 1 and on day 3, start supplementing with NT3 extract. Monitor fish mortality daily. Evaluating the effectiveness of treatment of haemorrhagic disease in fish by determining the survival rate and disease manifestations.

2.5. Data analysis

The data is processed on Microsoft Excel version 2016 and SPSS ver. 16.0 software; analysis of variance one-way ANOVA to compare differences in antibacterial diameters of extracts; virulence of bacteria and blood cells. Statistical testing was performed at the

n g x g n " q h " u k i p k h k e c p e g " r " Ö " 2 0 2 7 " c e

CHAPTER 3. RESEARCH RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Survey on farming situation and disease on fish in Thua Thien Hue

3.1.1. Farming fish situation

Cage-raised fish in Thua Thien Hue are mainly in the following localities such as Hai Duong, Thuan An, Vinh Hien and Loc Binh communes, the survey results have determined that 100% of households raise fish by cage culture. Fish only cultured one crop per year. Breeding time is usually in November and December every year. The average time of each crop is about 8 to 10 months. It depend on the size of the seed. The source of stocking stock for fish from wild sources only accounts for 17.4%, while 82.6% of households raising fish from local hatcheries are reared from seed sources in Quang Ninh, Nam Dinh, Nha Trang. Fish is stocked at a density of 40-70 fish m⁻³.

3.1.2. Disease situation on fish culture

Table 3.1. Some common diseases in cage-raised fish at the survey site (n=30)

No	Disease/pathogen	Number of household	Rate (%)
1	Fish leeches	7	23.3
2	Nerve necrosis	1	3.3
3	Fungi	2	6.6
4	Haemoharrgic	23	76.7
5	Intestinal	5	16.7
6	Stomach bloat	3	10.0

[Source: Survey result, 2018]

3.2. Isolation and identification of *Vibrio* strains causing hemorrhagic disease in fish

3.2.1. Pathological signs of fish disease caused by *Vibrio* bacteria



Figure 3.1. Characteristic signs of fish with hemorrhagic disease with the appearance of red spots on the abdominal cavity; fins, and tails torn and bleeding (arrows, Figures A, C); liver enlargement and hemorrhage (arrow, Figure B); Mucus accumulation in the abdominal cavity (arrow, Figure D)

3.2.2. Results of bacterial identification by Nucleotide sequencing of 16S rRNA gene segments of 48 isolates of bacteria

3.2.2.2. Results of nucleotide sequence analysis of 16S rRNA . gene region

Table 3.6. Results of identification of bacterial strains isolated from hemorrhagic fish based on 16S rRNA gene region

No	Bacterial strain	Genbank code	Reference number of GenBank	Similarity ratio (%)	Site
1	<i>V. alginolyticus</i> YHTH7	MT953948	MN874162.1	98.06	Thuan An
2	<i>V. alginolyticus</i> YN14	MT953951	MH298564.1	98.05	Thuan An
3	<i>V. alginolyticus</i> YVL22	MT953953	MN843961.1	99.72	Thuan An
4	<i>V. alginolyticus</i> YVL24	MT953954	MN938185.1	99.86	Thuan An
5	<i>V. alginolyticus</i> YVL26	MT953955	CP051109.1	99.59	Thuan An
6	<i>V. alginolyticus</i> YN19	MT953961	MH298564.1	98.05	Thuan An
7	<i>V. alginolyticus</i> YN29	MT953962	MN843961.1	99.72	Thuan An
8	<i>V. alginolyticus</i> YVL31	MT953963	MN938185.1	99.86	Thuan An
9	<i>V. alginolyticus</i> YVL40	MT953964	CP051109.1	99.59	Thuan An
10	<i>V. alginolyticus</i> YVL43	MT953965	MN938360.1	99.65	Thuan An
11	<i>V. alginolyticus</i> YN34	MT953957	MN938360.1	99.65	Thuan An
12	<i>V. alginolyticus</i> YHTH44	MT953967	MN874162.1	98.06	Thuan An
13	<i>V. alginolyticus</i> YN38	MT953974	MH298564.1	98.05	Thuan An
14	<i>V. alginolyticus</i> YVL84	MT953975	MN843961.1	99.72	Thuan An

No	Bacterial strain	Genbank code	Reference number of GenBank	Similarity ratio (%)	Site
15	<i>V. alginolyticus</i> YVL85	MT953976	MN938185.1	99.86	Thuan An
16	<i>V. alginolyticus</i> YVL86	MT953977	CP051109.1	99.59	Thuan An
17	<i>V. alginolyticus</i> YHD1	MZ753696	MH298564.1	98.05	Hai Duong
18	<i>V. alginolyticus</i> YHD3	MZ753698	CP051109.1	99.59	Hai Duong
19	<i>V. alginolyticus</i> YHD12	MZ753707	MH298564.1	98.05	Hai Duong
20	<i>V. alginolyticus</i> YHD13	MZ753708	MN938360.1	99.65	Hai Duong
21	<i>V. alginolyticus</i> YHD14	MZ753709	MN938360.1	99.65	Hai Duong
22	<i>V. alginolyticus</i> YHD5	MZ753700	MN843961.1	99.72	Hai Duong
23	<i>V. alginolyticus</i> YHD7	MZ753702	MN938185.1	99.86	Hai Duong
24	<i>V. alginolyticus</i> YHD8	MZ753703	CP051109.1	99.59	Hai Duong
25	<i>V. alginolyticus</i> YHD10	MZ753705	MN938185.1	99.86	Hai Duong
26	<i>V. alginolyticus</i> YHD16	MZ753711	MN843961.1	99.72	Hai Duong
27	<i>V. alginolyticus</i> YHD17	MZ753712	CP051109.1	99.59	Hai Duong
28	<i>V. alginolyticus</i> YHD18	MZ753713	MN938185.1	99.86	Hai Duong
29	<i>V. azureus</i> YVL11	MT953949	KT986135.1	100	Thuan An
30	<i>V. azureus</i> HTH12	MT953950	KT986135.1	100	Thuan An
31	<i>V. azureus</i> YVL5	MT953958	KT986135.1	100	Thuan An
32	<i>V. azureus</i> HTH6	MT953959	KT986135.1	100	Thuan An
33	<i>V. azureus</i> YVL33	MT953971	KT986135.1	100	Thuan An
34	<i>V. azureus</i> YHTH35	MT953972	KT986135.1	100	Thuan An
35	<i>V. azureus</i> YVL45	MT953968	KT986135.1	100	Thuan An
36	<i>V. azureus</i> YVL46	MT953969	KT986135.1	100	Thuan An
37	<i>V. fluvialis</i> YHTH16	MT953952	CP051126.1	100	Thuan An
38	<i>V. fluvialis</i> YHTH18	MT953960	CP051126.1	100	Thuan An
39	<i>V. fluvialis</i> YHTH47	MT953970	CP051126.1	100	Thuan An
40	<i>V. fluvialis</i> YHTH37	MT953973	CP051126.1	100	Thuan An
41	<i>V. fluvialis</i> YHD4	MZ753699	CP051126.1	100	Hai Duong
42	<i>V. fluvialis</i> YHD6	MZ753701	CP051126.1	100	Hai Duong
43	<i>V. fluvialis</i> YHD9	MZ753704	CP051126.1	100	Hai Duong
44	<i>V. orientalis</i> YVL27	MT953956	MN945276.1	100	Thuan An
45	<i>V. orientalis</i> YVL42	MT953966	MN945276.1	100	Thuan An
46	<i>V. orientalis</i> YHD2	MZ753697	MN945276.1	100	Hai Duong
47	<i>V. orientalis</i> YHD11	MZ753706	MN945276.1	100	Hai Duong
48	<i>V. orientalis</i> YHD15	MZ753710	MN945276.1	100	Hai Duong

The results of identification of 48 bacterial strains isolated from hemorrhagic fish in Thua Thien Hue showed that 48 bacterial strains belong to the genus *Vibrio*, including 4 species.: *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. fluvialis* and *V. orientalis*.

3.2.3. Genetic diversity analysis

Table 3.12. Genetic diversity of isolated *Vibrio* strains based on 16S rRNA gene region

Qu n th	N	S	Eta	H	Hd	K	Pi * z 3 2
THUAN AN	30	98	98	9	0.87 ± 0.032	26.331	18.360 ± 2.820
HAI DUONG	18	84	84	7	0.902 ± 0.031	25.118	18.240 ± 3.490
Total	48	94	94	9	0.897 ± 0.013	24.794	18.010 ± 2.170

Note: Number of samples in a population (*n*); Number of polymorphic positions (*S*); Total number of mutation sites (*Eta*); Haplotype number (*h*); Haplotype diversity on genes (*Hd*); Nucleotide diversity per site (*Pi*); Mean number of distinct nucleotides (*k*); All indices were treated with statistical significance $p < 0.05$.

3.3. Biological characteristics of isolated strains of *Vibrio* bacteria

3.3.1. Biochemical characteristics of isolated strains of *Vibrio* bacteria

Table 3.10-3.13. Biochemical characteristics of *V. alginolyticus*, *V. azureus*, *V. fluvialis*, *V. orientalis*

TT	Factor	<i>V. alginolyticus</i> n=28	<i>V. azureus</i> n=8	<i>V. fluvialis</i> n=7	<i>V. orientalis</i> n=5
1	Gram staining	-	-	-	-
2	Form	Comma	Curved rod	Curved rod	Curved rod
3	Colonies on TCBS	Yellow	Green	Yellow	Green
4	Colonies on TSA	Miky white	Miky white	Miky white	Miky white
5	Growth in NaCl				
	0%	-	-	-	-
	1%	+	+	+	+
	6%	+	+	+	+
	8%	+(25/28)	-	-	+
	10%	-/+	-	-	-
6	API 20E	414725	0245004	3246126	4066106

TT	Factor	<i>V. alginolyticus</i> n=28	<i>V. azureus</i> n=8	<i>V. fluvialis</i> n=7	<i>V. orientalis</i> n=5
7	Oxidase	+	+	+	+
8	Catalase	+	+	+	+
9	H ₂ S synthesis	-(24/25)	-	-	-
10	NO ₃ decomposition	+	-	+	+
11	Indol	-	+	+	+
12	Voges- Proskauer	+	-	-	-
13	Citrate using	+	-	+	-
14	Glucose	+	+	+	-
15	Mannitol	+	-	+	+
16	Sorbitol	+	-	-	-
17	Sucrose	+	-	+	-
18	Arabinose	-	-	+	+

3.3.2. Results of determining the presence of toxic genes of isolated bacterial strains

In this study, 39/48 strains of *Vibrio* were found to contain at least 1 toxic gene. Among those bacteria, up to 4/30 strains of *Vibrio* bacteria contain 3 toxic genes. However, no strain of *Vibrio* bacteria carried all 4 virulence genes simultaneously. Among the four toxin genes (*toxR*, *tdh*, *trh* and *tlh*) found from *Vibrio* spp. causing haemorrhagic disease in cage-raised fish in Thua Thien Hue, the most common toxin gene was the *tlh* gene including 29/48 strains, the *toxR* gene was detected in 22 isolates (22/48), the *trh* gene was detected in 22 isolates (22/48) *trh* is 13/48 isolates, the lowest is *tdh* gene detected only in 3/48 isolates.

3.3.3. Research results on the virulence of *Vibrio* bacteria on fish

3.3.3.1. The results of determining the virulence of *Vibrio* strains isolated on fish suffering from hemorrhagic disease

Table 3.16. The results of determining the virulence of *Vibrio* strains isolated on fish suffering from hemorrhagic disease

No	Bacterial strain	Number of strain	Total number of strains causing fish death
1	<i>V. alginolyticus</i>	28	23/28
2	<i>V. azureus</i>	8	0
3	<i>V. fluvialis</i>	7	0
4	<i>V. orientalis</i>	5	0

3.3.3.2. Results of determining the virulence of *V. alginolyticus* strains isolated from hemorrhagic fish

* Results of virulence determination of *V. alginolyticus* strains

There were 4 strains of bacteria *V. alginolyticus* YVL22, *V. alginolyticus* YVL24, *V. alginolyticus* YHTH44, *V. alginolyticus* YHD7 causing fish survival rate of 100% in the first 3 days of the experiment, so these 4 strains were used for research. Next to investigate the virulence factors of *V. alginolyticus* strains under *in vitro* and *in vivo* conditions

* Results of investigation of virulence factors of *V. alginolyticus* strains isolated under *in vitro* conditions

Table 3.18. Some virulence factors of *V. alginolyticus* strains isolated under *in vitro* conditions

No	Strain	Toxin gene	Active area diameter (mm) (Mean \pm SD)		
			Caseinase	Mobility	Hemolysis on sheep jelly blood
1	YHD7	<i>ToxR, tdh, tlh</i>	27.8 ^c \pm 0.25	50.7 ^c \pm 0.58	16.8 ^c \pm 0.10
2	YVL24	<i>ToxR, tdh, tlh</i>	27.7 ^c \pm 0.29	50.2 ^c \pm 0.29	16.7 ^c \pm 0.10
3	YVL22	<i>ToxR, trh, tlh</i>	27.2 ^b \pm 0.29	46.2 ^b \pm 0.25	15.5 ^b \pm 0.15
4	YHTH44	<i>ToxR, trh, tlh</i>	27.2 ^b \pm 0.21	45.9 ^b \pm 0.12	15.5 ^b \pm 0.06
5	YHD3	-	21.2 ^a \pm 0.25	32.7 ^a \pm 0.58	12.7 ^a \pm 0.25

3.3.4. Pathological characteristics of fish infected with *V. alginolyticus* strains and 50% lethal dose (LD50)

3.3.4.1. Signal of fish disease

Infectious results showed that all diseased fish in the treatments with 4 strains of *V. alginolyticus* had lethargy swimming with signs of red and bleeding spots on the fish's body. In particular, when dissecting internal organs such as the liver, there is bleeding, the abdominal cavity accumulates fluid and has a bad smell.

3.3.4.2. Virulence and pathogenicity of *V. alginolyticus*

The results of the experiment to determine the LD50 of four strains of *V. alginolyticus* (YHD7, YVL24, YVL22 and YHTH44) on fish were: 6.5×10^5 ; 8.1×10^5 ; 1.7×10^6 ; và 1.9×10^6 CFU mL⁻¹.

3.3.5. Histopathological characteristics of fish infected with *V. alginolyticus*

The results of histological study of fish infected with *V. alginolyticus* under experimental conditions showed that *V. alginolyticus* bacteria caused changes in tissue structure of the skin, liver, kidney, spleen and brain of fish. *V. alginolyticus* causes hemorrhage in the tissues of the skin, liver, kidney, spleen and brain.

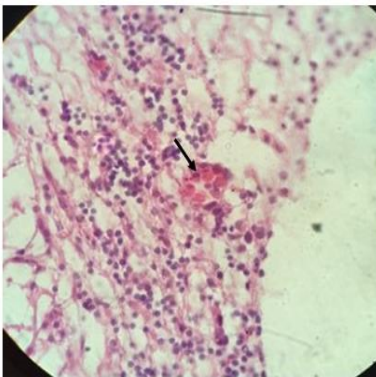


Figure 3.18. Brain tissue of fish infected with *V. alginolyticus* (100X), hemorrhage in the brain of infected fish (arrow)

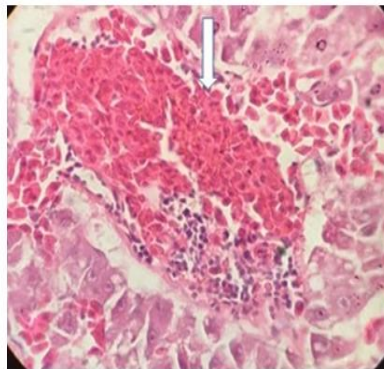


Figure 3.19. Cod liver tissue infected with *V. alginolyticus* bacteria (100X), with many blood cells and vacuoles (arrow).

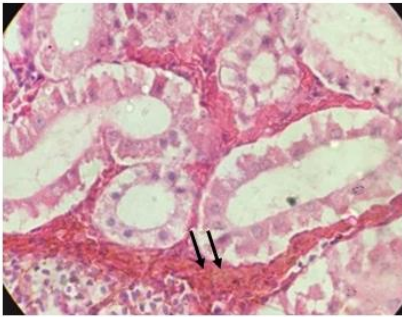


Figure 3.20. Fish kidney tissue infected with bacteria *V. alginolyticus* (100X)

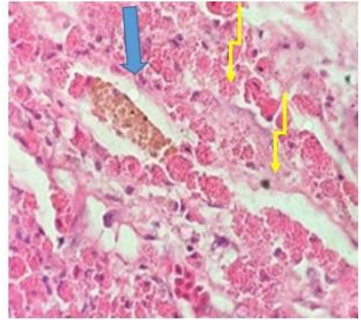


Figure 3.21. Spleen tissue of fish infected with *V. alginolyticus* (100X). Splenic tissue disease showed necrotic areas (yellow arrows). Melanin macrophage center (blue arrow).

3.3.6. Evaluation of the susceptibility of *V. alginolyticus* strains to some antibiotics

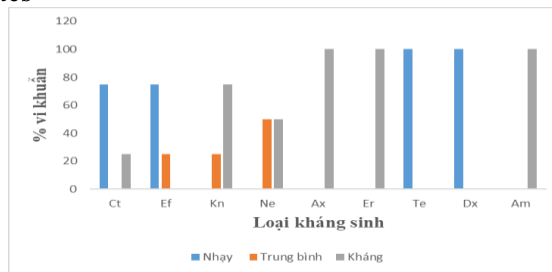


Figure 3.23. Percentage (%) of strains of *V. alginolyticus* resistant and sensitive to antibiotics

The results of assessment of susceptibility of *V. alginolyticus* strains to 9 antibiotics (Figure 3.23) showed that bacteria were completely resistant to antibiotics such as Ampicillin, Amoxicillin, and Erythromycin, accounting for 100% and antibiotics such as Kanamycin (75%) and Neomycin (50%). Besides, it was also found that *V. alginolyticus* bacteria was sensitive to antibiotics,

respectively: Tetracycline (100%), Doxycycline (100%), Cefotaxime (75%) and Enrofloxacin (75%).

3.4. Research results on the use of plant extract in the prevention and treatment of hemorrhagic disease caused by *Vibrio* bacteria in fish

3.4.4. Antibacterial effect against *V. alginolyticus* of plant extract

3.4.4.1. Antibacterial activity against *V. alginolyticus* strains of plant extract

Table 3.22. Diameter of antibacterial against *V. alginolyticus* of plant extract

Concentration mg mL ⁻¹	<i>V. alginolyticus</i>			
	YHD7	YVL24	YVL22	YHTH44
100	10.3 ^a ±0.29	10.4 ^a ± 0.12	11.3 ^a ± 0.25	11.3 ^a ± 0.15
200	12.2 ^b ±0.29	12.3 ^b ± 0.17	14.6 ^b ± 0.17	14.4 ^b ± 0.12
300	14.7 ^c ±0.15	15.8 ^c ± 0.25	17.2 ^c ± 0.15	17.1 ^c ± 0.17
400	17.1 ^d ±0.51	17.4 ^d ± 0.12	18.3 ^c ± 0.17	18.2 ^e ± 0.25
500	18.1 ^e ±0.12	18.3 ^e ± 0.25	19.1 ^f ± 0.21	19.1 ^f ± 0.12
Te (30ug)	16.8 ^d ±0.15	17.2 ^d ± 0.15	17.8 ^d ± 0.25	17.8 ^d ± 0.12
E Ø)*	0	0	0	0

Plant extract in Ethanol solvent at concentrations of 100 - 500 mg mL⁻¹ are resistant to *V. alginolyticus* bacteria, with the highest concentration at 500 mg mL⁻¹ with diameter of antibacterial is the largest ($p < 0.05$)

3.4.4.2. Determination of minimum inhibitory concentration and minimum destructive concentration of plant extract on tested bacterial strains

Table 3.23. Minimum inhibitory concentration and minimum destructive concentration of plant extract on *V. alginolyticus* strains

Strain	Bacterial density (CFU mL ⁻¹)	MIC (mg mL ⁻¹)	MBC (mg mL ⁻¹)	MBC/MIC
YVL24	10 ⁶	25	50	2
YHD7		25	50	2
YVL22		25	50	2
YHTH44		12,5	25	2

The ratio of MBC/MIC value 0.6 " u j q y u " v j c v " v j g " has the ability to kill bacteria. This shows that the plant extract has the ability to kill all five strains of *V. alginolyticus* causing hemorrhagic disease on fish.

3.4.4.3. Evaluation of the safety threshold of plant extract on fish

The survival rate of fish in all experimental treatments reached 100%; Therefore, the LC₅₀ value of plant extract could not be determined. This result shows that the use of extract is safe for fish.

3.4.5. Efficacy of preventing haemorrhagic in fish of plant extract

3.4.5.1. The results of determining the hematological parameters of fish blood cell density

Table 3.25. Blood cell density ($\times 10^6$ cells mm^{-3})

Experiment	Day 4 th	Day 7 th	Day 10 th	Day 14 th
NT1	2.19 ^a ± 0.11	2.61 ^b ± 0.13	2.86 ^b ± 0.12	2.75 ^b ± 0.12
NT2	2.22 ^a ± 0.13	2.64 ^b ± 0.14	2.88 ^b ± 0.15	2.78 ^b ± 0.14
NT3	2.30 ^a ± 0.14	2.69 ^b ± 0.16	2.92 ^b ± 0.22	2.81 ^b ± 0.19
NT4	2.15 ^a ± 0.11	2.04 ^a ± 0.11	2.20 ^a ± 0.14	2.28 ^a ± 0.12
NT5	2.13 ^a ± 0.12	2.15 ^a ± 0.12	2.36 ^a ± 0.11	2.74 ^b ± 0.13

Note: the above values are Mean ± SE, different values with letters a, b, c on the same column have statistical significance ($p < 0.05$). In which: NT1 (addition of 5% extract, inject bacteria); NT2 (addition of 6% extract, bacterial injection); NT3 (addition of 7% extract, bacterial injection); NT4 (bacteriostatic injection, no extract added); NT5 (injection of physiological saline, no extract added).

White blood cell density

Table 3.26. Total white blood cell ($\times 10^5$ cell mm^{-3})

Experiment	Day 4 th	Day 7 th	Day 10 th	Day 14 th
NT1	2.12 ^a ± 0.13	3.05 ^c ± 0.14	3.21 ^c ± 0.16	3.18 ^b ± 0.23
NT2	2.18 ^a ± 0.19	3.09 ^c ± 0.15	3.30 ^c ± 0.12	3.27 ^b ± 0.17
NT3	2.30 ^a ± 0.15	3.15 ^c ± 0.23	3.39 ^c ± 0.18	3.33 ^b ± 0.25
NT4	1.95 ^a ± 0.11	2.51 ^b ± 0.15	2.62 ^b ± 0.13	2.86 ^b ± 0.11
NT5	1.93 ^a ± 0.16	1.95 ^a ± 0.17	2.10 ^a ± 0.16	2.23 ^a ± 0.18

3.5.4.2. Survival rate

Table 3.27. Survival rate of fish

TT	Experiment	Survival rate (%)
1	NT1	70.00 ^b ± 5.77
2	NT2	73.33 ^b ± 3.33
3	NT3	83.33 ^{bc} ± 6.67
4	NT4	36.67 ^a ± 3.33
5	NT5	96.67 ^c ± 3.33

Thus, with the successful test results in the experiment, it was determined that plant extract and feed for fish prevented haemorrhagic disease occurring in fish under *in vivo* conditions.

3.4.6. Experimental results on the treatment of haemorrhagic disease in fish with plant extract

Table 3.28. Survival rate of fish

TT	Experiment	Survival rate (%)
3	NT1	63.33 ^b ± 6.67
4	NT2	33.33 ^a ± 3.33
5	NT3	96.67 ^c ± 3.33

The results showed that the treatment fed with food supplemented with 7% of Diep Ha Chau extract had a survival rate of 63.33%; In that case, the treatment without adding Diep Ha Chau extract to the feed, the survival rate was only 33.33%. That shows the effectiveness of using the extract in the treatment of hemorrhagic disease in fish under *in vivo* conditions.

CHAPTER 4. DISCUSSION

1. Isolation and determination

All 48 strains of *Vibrio* from hemorrhagic fish samples in Thua Thien Hue were isolated and identified, including: 28 strains of *V. alginolyticus*, 8 strains of *V. azureus*; 7 strains of *V. fluvialis* and 5 strains of *V. orientalis*. In the study, the level of *16S rRNA* gene homology on Genbank ranged from 98.05 to 100%. At the same time, all nucleotide sequences of bacterial strains are registered on the world gene bank with reference codes.

2. Determination of presence of some toxin genes from bacterial isolates

39/48 strains of *Vibrio* contained at least one toxin gene. Among those bacteria, up to 6/30 strains of *Vibrio* bacteria contain 3 toxin genes. However, no strain of *Vibrio* bacteria carried all four toxin genes simultaneously. Among the four toxin genes (*toxR*, *tdh*, *trh* and *tlh*) found from *Vibrio* spp. causing haemorrhagic disease in caged fish in Thua Thien Hue, the most common toxin gene was the *tlh* gene including 29/48 strains, the *toxR* gene was detected in 22 isolates (22/48), the *toxR* gene was detected in 22 isolates (22/48). *Trh* was 13/48 isolates, the lowest was *tdh* gene detected only in 3/48 isolates.

3. Virulence of *Vibrio* strains isolated on fish

4 bacterial strains *V. alginolyticus* YVL22, *V. alginolyticus* YVL24, YHTH44, *V. alginolyticus* YHD7 are the main causative agents of hemorrhagic disease in caged fish (*S. ocellatus*) in Thua Thien Hue. The virulence and lethal dose LD₅₀ of 4 strains of *V. alginolyticus* (YHD7, YVL24, YVL22 and YHTH44) are: 6.5×10^5 ; 8.1×10^5 ; 1.7×10^6 ; and 1.9×10^6 CFU mL⁻¹. The signs of disease in fish after experimental disease in this study were completely similar to the typical pathological signs of diseased fish obtained in the wild.

4. Plant extracts

Application of herbal extract (*P. amarus*) in the test against *V. alginolyticus* bacteria, determining the safety threshold of plant extract for fish as well as the effect of the extract on the hematological parameters and survival rate of experimental red snapper, towards the safe use of herbs in aquaculture

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

4.1. Conclusion

1. Cage-raised fish in Thua Thien Hue are mainly in localities such as Hai Duong, Thuan An, Vinh Hien and Loc Binh communes. The most common diseases of fish were hemorrhagic diseases, (23/30 households, accounting for 76.7%), fish leech disease (23.3%), intestinal tract (16.7%).

2. The study isolated and identified 48 strains of *Vibrio* from diseased fish samples in Thua Thien Hue, including: 28 strains of *V. alginolyticus*, 8 strains of *V. azureus*; 7 strains of *V. fluvialis* and 5 strains of *V. orientalis*. The 16S rRNA gene structure of *Vibrio* strains in two populations collected at Thuan An and Hai Duong sites on the same object in fish is relatively stable in both structure and species composition.

3. The presence of toxic genes has been determined in 48 *Vibrio* strains isolated from hemorrhagic fish, of which 39 strains contain at least one toxin gene (including: 29/39 strains carrying *tlh* gene, 13/39 strains carry the *trh* gene, 3/39 have the *tdh* gene, 22/39 have the *toxR* gene). There are 16 strains carrying both toxin genes (9 strains carrying 2 genes were *toxR* and *tlh*; 1 strain carrying 2 genes were *toxR* and *tdh*; 1 strain carrying 2 genes were *toxR* and *trh*; 4 strains carrying 2 genes were *trh* and *tlh*. Strains carrying all 3 toxin genes (*toxR*, *tlh*, *trh*) that are *V. orientalis* YHD2; *V. orientalis* YVL42; *V. alginolyticus* YVL22, *V. alginolyticus* YHTH44 and 2 strains carrying 3 toxin genes (*toxR*, *tlh*, *tdh*) these are *V. alginolyticus* YVL24 and *V. alginolyticus* YHD7.

4. The virulence and lethal dose LD₅₀ of 4 strains of *V. alginolyticus* YHD7, YVL24, YVL22 and YHTH44 have been determined, respectively: 6.5×10^5 ; 8.1×10^5 ; 1.74×10^6 and 1.9×10^6 CFU mL⁻¹ are the main causative agents of hemorrhagic disease in fish. Experimental disease causing fish had the same pathological signs as cage-raised fish when collecting samples: skin, fins, bleeding eyes, enlarged internal organs. Results of histopathological study of fish infected with *V. alginolyticus* under experimental conditions with *V. alginolyticus* bacteria showed hemorrhage and necrosis on liver, kidney, spleen, brain and muscle tissues. Besides, these four strains of bacteria are sensitive to antibiotics such as

Tetracycline, Doxycycline, Cefotaxime and completely resistant to antibiotics Amoxicillin, Ampicillin, Erythromycin.

6. Plant extract was able to inhibit 4 strains of *V. alginolyticus* in fish with hemorrhagic with MIC value ranging from 6.25 to 25 mg mL⁻¹ and MBC value at least 25 to 50 mg mL⁻¹

7. Fish fed with food supplemented with plant extract had an increased number of red blood cells and an increased total white blood cell. The survival rate of fish in hemorrhagic disease prevention treatments ranged from 36.67 to 96.67%. For the survival rate of fish in hemorrhagic disease treatment adding 7% of plant extract to the feed and feeding the fish when there are clinical signs, the survival rate reached 63.33% is than the diseased fish and without adding plant extract to the feed, the survival rate was only 33.33%.

4.2. Recommendation

1. Further study on the toxins and genes responsible for the pathogenicity of *V. alginolyticus* in fish

2. Research on integrated solutions in the prevention and treatment of hemorrhagic diseases in marine fish farming to rapidly increase marine fish farming in Vietnam and apply plant preparations for transfer to production.

LIST OF PUBLICATIONS RELATED TO THE THESIS

TT	Title	Journal, Issue	Author	Rangking
1	The indentification and determination of toxin genes of <i>Vibrio</i> strains caused hemorrhagic disease on red drum (<i>Sciaenops ocellatus</i>) using PCR	AMB Express (2191-0855), 11(4), 2021, 1-8 https://doi.org/10.1186/s13568-020-01161-w	Pham Thi Hai Yen, Nguyen Quang Linh, Nguyen Duy Quynh Tram	SCIE/Q2
2	Antibacterial activity of <i>Phyllanthus amarus</i> extracts towards hemorrhagic disease in Red drum (<i>Sciaenops ocellatus</i>) caused by <i>Vibrio alginolyticus</i> strains (In Vietnamese)	Hue University of Science journal: Techniques and Technology, 130 (2A), 2021 https://doi.org/10.26459/hueunijtt.v130i2A	Ph m Thi Hai Yen, Nguyen Duy Quynh Tram Nguyen Quang Linh, Nguyen Anh Hieu	Vietnam State Council for Professor Titles
3	Isolation and determination of <i>Vibrio</i> spp. pathogen from <i>Sciaenops ocellatus</i> suffering from hemorrhagic disease under cage culture in Vietnam	Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences; vol 10(II), April, 2022, https://doi.org/10.18006/2022.10(2).405.415	Pham Thi Hai Yen, Nguyen Duy Quynh Tram, Nguyen Quang Linh	Scopus (Q4)
4	Investigation the current situation of fish cage cultured and disease of some economic brackish and marine fish species cultured in Thua Thien-Hue province (in Vietnamese)	Journal of Agriculture and Rural Development, 374:50-57, 2019 http://tapchikhoahocnongnghiep.vn/Pages/tap-chi-nong-nghiep-va-phan-trien-nong-thon-so-23-2019.aspx	Pham Thi Hai Yen, Tran Quang Khanh Van, Nguyen Khoa Huy Son, Nguyen Duy Quynh Tram	Vietnam State Council for Professor Titles

