

# NGHIÊN CỨU TẠO CHỦNG VI KHUẨN *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* ĐỘT BIẾN GIẢM ĐỘC LỰC

*Lê Minh Hải<sup>1</sup>, Phạm Thị Tâm<sup>2</sup>, Tô Long Thành<sup>3</sup>*

## TÓM TẮT

Chủng vi khuẩn, ký hiệu là T4.3, có những đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hoá phù hợp với chủng *P. damsaelae* đã phân lập được từ cá mắc bệnh lở loét trên da và đốm trắng ở nội tạng. Chủng vi khuẩn này đã được sử dụng để tạo chủng nhược độc bằng hai tác nhân là tia UV và rifampicine. Với tác nhân là tia UV qua các đời chiếu đã tạo ra 112 dòng vi khuẩn và với tác nhân là rifampicin đã lựa chọn được 50 dòng vi khuẩn có sự thay đổi về hình thái, những dòng vi khuẩn này đã được kiểm tra về mức độ giảm độc lực của chúng. Bằng phương pháp sàng lọc trên môi trường thạch máu cừu đã thu được 06 dòng vi khuẩn không gây dung huyết, trong đó 4 dòng vi khuẩn T4.3K6, T4.3K7, T4.3K8.1, T4.3K8.2 được tạo ra bởi phương pháp gây đột biến bằng rifampicin, 2 dòng vi khuẩn T4.3U5, T4.3U6 được tạo ra bởi phương pháp gây đột biến bằng tia UV. 6 dòng vi khuẩn không còn độc tổ dung huyết được sử dụng để đánh giá khả năng gây bệnh trên cá mú nhằm chứng minh mức độ giảm độc lực của chúng. Kết quả nghiên cứu cho thấy các dòng đột biến đều giảm độc lực đáng kể so với chủng giống gốc. So sánh độc lực của 6 dòng đột biến chúng tôi nhận thấy: 2 dòng T4.3K8.2, T4.3U6 là an toàn hơn so với 04 dòng còn lại, tỷ lệ cá sống sót ngay sau khi gây nhiễm với các liều 104, 105, 106 CFU/ml của các dòng T4.3K8.2, T4.3U6 tương ứng là 93,33%, 83,33%, 83,33% và 93,33%, 93,33%, 90%. Thời gian gây chết cá của các dòng này là 8-20 ngày. Cá chết có các biểu hiện biếng ăn, mang nhợt nhạt, mắt cá lồi đục, xuất huyết rải rác trên vây.

*Từ khoá:* *P. damsaelae*, Cá biển, Bệnh tụ huyết trùng, Xuất huyết, Nhược độc, Đột biến.

## Creating the attenuated mutant strains of *Photobacterium damsaelae*

*Le Minh Hai, Phạm Thị Tâm, Tô Long Thành*

## SUMMARY

A bacteria strain signing T4.3, having the morphological, physiological and biochemical characteristics of *P. damsaelae* was isolated from the Pasteurellosis infected fish. It was used to create the attenuated bacteria strains by ultraviolet (UV) and rifampicin. Applying these factors, 162 modified clones, including 112 clones were generated by UV and 50 clones were obtained by rifampicin. By screening on the sheep blood agar medium, 6 bacteria strains without causing haemolysis were obtained. Of which, 4 bacteria strains namely T4.3K6, T4.3K7, T4.3K8.1, T4.3K8.2 were created by rifampicin, 2 bacteria strains namely T4.3U5, T4.3U6 were created by UV. These bacteria strains were used to evaluate the ability of causing disease in grouper in order to prove their virulence reduction. The studied result showed that 02 strains (T4.3K8.2, T4.3U6) were safer than 04 others. The survival rate of fish just after infection with dose of 104, 105, 106 CFU/ml of T4.3K8.2 and T4.3U6 was 93.33%, 83.33%, 83.33% and 93.33%, 93.33%, 90%, respectively. Lethal time of the experimental fish was from 8-20 days with the typical signs of Pasteurellosis, such as anorexia, pale gill, opaque convex ankle and haemorrhagic on the fins.

*Keywords:* *P. damsaelae*, Seafish, Pasteurellosis, Haemorrhagic, Attenuated, Mutant.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bệnh tụ huyết trùng ở cá (*Photobacteriosis* hay *Pasteurellosis*) còn được gọi là xuất huyết

nhiễm trùng, gây ra bởi vi khuẩn ưa mặn *Photobacterium damsaelae*.

Vi khuẩn *P. damsaelae* có thể tấn công và gây bệnh trên cá biển nuôi ở tất cả các giai đoạn phát triển của cá, từ giai đoạn ấu trùng, cá giống đến

<sup>1</sup> Trường Đại học Vinh

<sup>2</sup> Viện Đại học Mở Hà Nội

<sup>3</sup> Trung tâm Chẩn đoán Thú y Quốc gia

cá nuôi thương phẩm. Khi bị bệnh, cá có thể biểu hiện ở dạng mạn tính và cấp tính, biểu hiện bệnh tụ huyết trùng như: gây loét trên da, xuất hiện các nốt kem trắng hoặc u hạt tubercules màu trắng ở một số cơ quan nội tạng, gây hoại tử trong nội tạng, tập trung ở thận và lách, gây nhiễm trùng và hoại tử rộng rãi (Evelyn, 1996, Romalde, 2002; Bames và các cộng sự, 2005). Cá bệnh có thể chết sau 5-10 ngày với tỷ lệ cao từ 80-100%, gây thiệt hại kinh tế ở các nước như: Nhật, Mỹ, Pháp, Tây Ban Nha, Hy Lạp, Thổ Nhĩ Kỳ. Ở Việt Nam, bệnh phân bố ở hầu hết các vùng nuôi trên cả nước.

Hiện nay, người nuôi cá biển chủ yếu sử dụng kháng sinh trong điều trị bệnh. Để giảm thiểu sử dụng kháng sinh, việc nghiên cứu tạo vaccin là rất cần thiết. Trong các phương pháp tạo vaccin, phương pháp tạo chủng vi khuẩn nhược độc bằng kỹ thuật gây đột biến thực nghiệm tạo ra vaccin sống nhược độc là phương pháp phổ biến và rất hữu hiệu.

Nghiên cứu này được thực hiện với mục đích tạo chủng vi khuẩn *P. damsela* đột biến có độc lực giảm, làm nguyên liệu sản xuất vaccin để làm cơ sở cho công tác phòng bệnh ở một số loài cá nước mặn như cá mú, cá chẽm, cá hồng và cá giò.

## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Photobacterium damsela* T4.3 có LD<sub>50</sub> là 10<sup>4,3</sup> được phân lập từ 17 mẫu cá (cá mú, cá hồng, cá giò, cá bớp) có dấu hiệu của bệnh tụ huyết trùng: có vết loét trên da, bong tróc vảy, xuất huyết trên da, xuất huyết vây ngực, da tối màu, bơi dử dột khác thường, ở vùng biển Quảng Ninh, Hải Phòng, Nam Định.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Phương pháp phân lập và nuôi cấy vi khuẩn

*P. damsela* được phân lập trên các mẫu gan, thận, da, mắt, vây cá thu nghi mắc bệnh

tụ huyết trùng. Nghiền mẫu trong dung dịch nước muối 1,5%, rồi tăng sinh trong môi trường BHI vô trùng. Nuôi lác ở 28°C, 150 vòng/phút trong vòng 24 giờ. Canh khuẩn tăng sinh được pha loãng theo hệ số 10<sup>-1</sup>- 10<sup>-7</sup> rồi cấy trên môi trường Marine agar. Nuôi trong tủ ẩm ở điều kiện 28°C trong 24 giờ. Những khuẩn lạc có đặc điểm điển hình của vi khuẩn *P. damsela* trên môi trường Marine agar (khuẩn lạc hình tròn, lồi, bóng, có màu hồng hơi nâu hoặc màu trắng đục) được thu thập để xác định loài dựa trên đặc điểm hình thái vi khuẩn, đặc điểm sinh hóa, đặc điểm phân tử.

#### 2.2.2. Phương pháp tạo chủng nhược độc bằng kỹ thuật gây đột biến thực nghiệm

##### 2.2.2.1. Phương pháp gây đột biến giảm độc lực bằng tia cực tím

Chủng vi khuẩn *P. damsela* T4.3 được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường Nutrient broth (Sigma, 70148) ở 28°C trong 24 giờ. Pha loãng sinh khối vi khuẩn để đạt mật độ 10<sup>8</sup>cfu/ml (0.2 ở bước sóng OD600nm) rồi cấy trải trên môi trường Nutrient agar (Sigma, N9405). Đĩa cấy vi khuẩn được chiếu tia UV (cường độ ánh sáng 65 W) trong 1, 2, 3, 4, 5, 10 phút ở khoảng cách 30cm (Preecha et al., 2010). Đĩa xử lý UV được nuôi cấy trong tủ ẩm 28°C, trong điều kiện không có ánh sáng cho đến khi xuất hiện các khuẩn lạc.

Các khuẩn lạc mọc trên đĩa được cấy lại trên môi trường Nutrient agar và tiếp tục xử lý UV với điều kiện như trên. Các khuẩn lạc trên đĩa xử lý UV lặp lại được cấy lại trên môi trường Nutrient agar, các khuẩn lạc có hình thái biến đổi được lựa chọn để đánh giá sự biến đổi về độc lực thông qua các phương pháp kiểm tra mức độ gây dung huyết và mức độ gây bệnh trên cá.

##### 2.2.2.2. Phương pháp gây đột biến bằng kháng sinh rifampicin

Chủng vi khuẩn *P. damsela* T4.3 được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường Nutrient broth (Sigma, 70148) ở 28°C trong 24 giờ. Pha loãng

sinh khối vi khuẩn để đạt mật độ  $10^8$ cfu/ml (0.2 ở bước sóng OD600nm) rồi cấy trải trên môi trường Nutrient agar (Sigma, N9405). Lấy các khuẩn lạc đơn cấy chuyển sang môi trường Nutrient agar bổ sung kháng sinh rifampicin (Sigma, 5723476) nồng độ 5  $\mu$ g/ml rồi tiếp tục nuôi cấy ở 28°C cho đến khi xuất hiện các khuẩn lạc.

Lấy ngẫu nhiên 2 khuẩn lạc riêng rẽ, đặt tên dòng rồi tiếp tục cấy riêng rẽ trên Nutrient agar bổ sung kháng sinh rifampicin (Sigma, 5723476) với nồng độ tăng dần. Quá trình này lặp lại cho đến khi nồng độ kháng sinh đạt 250  $\mu$ g/ml. Ở mỗi bước, các khuẩn lạc được thu lại để đánh giá sự biến đổi về độc lực thông qua các phương pháp kiểm tra mức độ gây dung huyết và mức độ gây bệnh trên cá.

### 2.2.3. Đánh giá khả năng gây dung huyết của các chủng vi khuẩn đột biến

Các dòng vi khuẩn đột biến được tăng sinh trong môi trường Nutrient broth (Sigma, 70148) rồi cấy gọt trên môi trường thạch máu (blood agar base- Sigma, 70133) + 5% máu cừu rồi nuôi trong tủ ấm 28°C. Kết quả phản ứng dung huyết được đọc sau 24 giờ.

### 2.2.4. Phương pháp gây nhiễm động vật thí nghiệm

Các dòng vi khuẩn đột biến đã được đánh giá giảm khả năng gây dung huyết, được tăng sinh trong môi trường Nutrient broth (Sigma, 70148) ở 28°C trong 24 giờ. Pha loãng sinh khối vi khuẩn để đạt mật độ  $10^5$ cfu/ml rồi tiêm phúc mạc cho cá mú có khối lượng 50-100g, khỏe mạnh và được nuôi 2 tuần trong bể của phòng thí nghiệm trước khi gây nhiễm.

Theo dõi cá trong 30 ngày, xác định liều  $LD_{50}$  theo công thức của Reed Muench, 1938.

### 2.2.5. Phương pháp đánh giá khả năng tạo kháng thể bảo hộ

Các dòng vi khuẩn đột biến đã được đánh giá giảm khả năng gây dung huyết và khả năng gây

bệnh được tăng sinh trong môi trường Nutrient broth (Sigma, 70148) ở 28°C trong 24 giờ. Pha loãng sinh khối vi khuẩn để đạt mật độ  $10^5$  cfu/ml, rồi tiêm phúc mạc cho cá mú có khối lượng 50-100g, khỏe mạnh, được nuôi trong bể nuôi phòng thí nghiệm 2 tuần trước khi gây nhiễm.

Sau 15 ngày gây miễn dịch, cá được thử thách bởi chủng tự nhiên T4.3 với liều công cường độ là  $10^8$  cfu/ml (Yong-hua Hu và cộng sự, 2012) theo dõi trong 4 tuần để đánh giá khả năng bảo hộ của dòng vi khuẩn đột biến giảm độc lực.

## III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Kết quả tạo dòng vi khuẩn *Photobacterium damsela* đột biến

Từ chủng T4.3 được phân lập từ cá mắc bệnh tụ huyết trùng có các đặc điểm hình thái, đặc tính sinh lý, sinh hoá phù hợp với *P. damsela*, chúng tôi tiến hành sử dụng hai tác nhân là tia UV và rifampicin để tạo chủng nhược độc. Kết quả được trình bày ở bảng 1 và bảng 2.

Từ bảng 1, chúng tôi nhận thấy qua 6 đời chiếu UV ở cùng 1 mật độ vi khuẩn ban đầu 300 cfu/đĩa và cường độ chiếu UV như nhau, chỉ khác nhau về thời gian chiếu giữa các lần, mật độ vi khuẩn sống sót tỷ lệ nghịch với thời gian chiếu. Sau đời chiếu thứ 3, khuẩn lạc vi khuẩn bắt đầu có sự biến đổi, khuẩn lạc chuyển từ dạng trơn bóng sang dạng nhám, bám chặt vào bề mặt môi trường nuôi cấy có thể là do có sự biến đổi về cấu trúc vỏ tế bào. Từ kết quả bảng 1, chúng tôi lựa chọn 112 dòng tế bào thu được sau đời xử lý UV thứ 3, với biểu hiện biến đổi hình thái khuẩn lạc để kiểm tra mức độ giảm độc lực.

Qua 8 đời sử dụng kháng sinh với nồng độ khác nhau, chúng tôi nhận thấy: số khuẩn lạc sống sót tỷ lệ nghịch với nồng độ kháng sinh bổ sung vào môi trường nuôi cấy. Cũng như tác động của tia UV, rifampicin có thể gây biến đổi vách tế bào vi khuẩn, vì vậy dẫn tới sự biến đổi về hình thái khuẩn lạc.

**Bảng 1. Kết quả tạo chủng vi khuẩn *P. damsela* đột biến nhược độc bằng tác nhân UV**

TT	Chủng vi khuẩn	Thời gian chiếu (phút)	Số khuẩn lạc sống sót (CFU/đĩa)	Hình thái khuẩn lạc
1	T 4.3 (chủng gốc)	0	300	Trắng trơn, tròn, bóng nhầy D = 1,5-2mm
2	T 4.3U <sub>1</sub>	1	59	Trắng trơn, tròn, bóng nhầy D = 1,2-1,8mm
3	T 4.3U <sub>2</sub>	2	56	Trắng trơn, tròn, bóng nhầy D = 1,2-1,5mm
4	T 4.3U <sub>3</sub>	3	55	Trắng, nhám, bám chặt vào bề mặt môi trường D = 1-1,3mm
5	T 4.3U <sub>4</sub>	4	25	Trắng, nhám, bám chặt vào bề mặt môi trường D=0,8-1,2mm
6	T 4.3U <sub>5</sub>	5	22	Trắng, nhám, bám chặt vào bề mặt môi trường D = 0,8-1mm
7	T 4.3U <sub>6</sub>	10	10	Trắng, nhám, bám chặt vào bề mặt môi trường D = 0,7-1mm

**Bảng 2. Kết quả tạo chủng vi khuẩn *P. damsela* đột biến nhược độc bằng tác nhân kháng sinh Rifampicin**

TT	Chủng vi khuẩn	Nồng độ kháng sinh (µg/ml)	Số khuẩn lạc sống sót (CFU/đĩa)	Hình thái khuẩn lạc
1	T 4.3 (chủng gốc)	0	300	Trắng trơn, tròn, bóng nhầy D = 1,5-2mm
2	T 4.3K <sub>1</sub>	5	107	Trắng trơn, tròn, bóng nhầy D = 1,5-2mm
3	T 4.3K <sub>2</sub>	10	98	Trắng trơn, tròn, bóng nhầy D = 1,5-2mm
4	T 4.3K <sub>3</sub>	25	77	Trắng trơn, tròn, bóng nhầy D = 1,5-2mm
5	T 4.3K <sub>4</sub>	50	53	Trắng trơn, tròn, bóng nhầy D = 1,5-2mm
6	T 4.3K <sub>5</sub>	100	33	Trắng trơn, tròn, bóng nhầy D = 1,4-1,8mm
7	T 4.3K <sub>6</sub>	150	25	Trắng, tròn, bóng D = 1,2-1,8mm
8	T 4.3K <sub>7</sub>	200	17	Trắng, tròn, bóng D = 1,2-1,8mm
9	T 4.3K <sub>8</sub>	250	8	Trắng, tròn, bóng D = 1,2-1,5mm

Từ kết quả ghi trong bảng 2, chúng tôi lựa chọn 50 dòng tế bào thu được sau đời xử lý rifampicin thứ 6, với biểu hiện biến đổi hình thái khuẩn lạc để kiểm tra mức độ giảm độc lực.

### 3.2. Kết quả đánh giá mức độ giảm độc lực của các dòng vi khuẩn *Photobacterium damsela* đột biến

#### 3.2.1. Đánh giá mức độ giảm khả năng dung huyết của các dòng vi khuẩn *Photobacterium damsela* đột biến

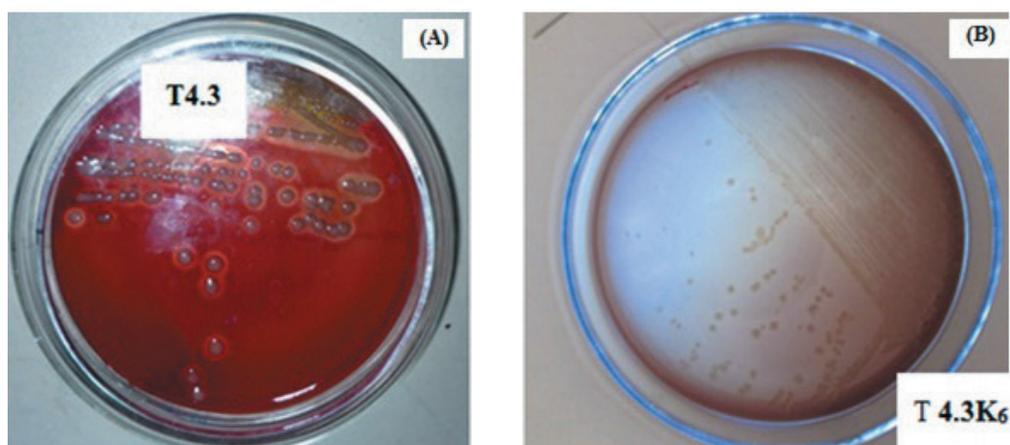
Độc tố dung huyết (haemolysin) là một trong

những yếu tố gây bệnh chủ yếu của vi khuẩn *Photobacterium damsela* đối với vật chủ. Độc tố haemolysin bám lên màng tế bào hồng cầu, làm thủng màng và giải phóng haemoglobin, gây hiện tượng dung huyết β. Đánh giá khả năng gây dung huyết của các chủng đột biến nhằm mục đích xem xét mức độ giảm độc lực của độc tố này thu được, kết quả ghi ở bảng 3 và hình 1.

Bằng phương pháp sàng lọc trên môi trường thạch máu cừu, chúng tôi đã thu được 6 dòng vi khuẩn không gây dung huyết, trong đó 4 dòng vi khuẩn T4.3K6, T4.3K7, T4.3K8.1, T4.3K8.2

**Bảng 3. Kết quả khả năng dung huyết của các dòng *Photobacterium damsela* đột biến**

Dòng vi khuẩn	Số lượng các dòng không gây dung huyết	Số lượng các dòng gây dung huyết ở các độ pha loãng độc tố								
		1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512
Vi khuẩn xử lý UV (n= 112)	2	110	110	110	110	110	110	92	87	72
Vi khuẩn xử lý rifampicin (n=50)	4	46	46	46	46	46	41	38	35	31

**Hình 1. Hình ảnh dung huyết thạch máu của các dòng vi khuẩn thí nghiệm**

(A: chủng T4.3 gây dung huyết  $\beta$  trên thạch máu cừu, B: Dòng T4.3K6 không gây dung huyết trên thạch máu cừu)

được tạo ra bởi phương pháp gây đột biến bằng rifampicin, 2 dòng vi khuẩn T4.3U5, T4.3U6 được tạo ra bởi phương pháp gây đột biến bằng tia UV.

Các dòng vi khuẩn gây dung huyết trên thạch máu được tăng sinh trong môi trường Nutrient Broth ở 28°C trong 24 giờ. Sinh khối vi khuẩn được xử lý bằng kháng sinh norfloxacin nồng độ 30 $\mu$ g/ml để diệt vi khuẩn rồi ly tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút, trong 15 phút. Dịch nổi được pha loãng theo hệ số 2 và cho kết hợp với hồng cầu cừu 5% để đánh giá mức độ gây dung huyết.

Nhìn chung 156 dòng vi khuẩn có biểu hiện thay đổi hình thái khuẩn lạc đều gây dung huyết hồng cầu cừu ở mức độ cao, 100% các dòng này đều gây dung huyết ở nồng độ pha loãng độc tố

là 1/64. Ở các độ pha loãng 1/132, 1/256, 1/512, số lượng các dòng gây dung huyết giảm, lần lượt là 92, 87, 72 dòng xử lý UV và 38, 35, 31 dòng xử lý rifampicin (bảng 3). Kết quả này chứng tỏ các tác nhân gây đột biến có ảnh hưởng làm giảm độc lực của độc tố dung huyết ở một số dòng vi khuẩn được tạo ra, tuy nhiên mức độ không nhiều.

6 dòng vi khuẩn không còn độc tố dung huyết được sử dụng để đánh giá khả năng gây bệnh trên cá mú và chứng minh mức độ giảm độc lực của chúng.

### 3.2.2. Đánh giá mức độ giảm độc lực của các dòng vi khuẩn *Photobacterium damsela* đột biến

Trên đối tượng động vật mẫn cảm, chúng tôi

sử dụng cá mú có kích thước 3cm để gây nhiễm bằng 6 dòng vi khuẩn là T4.3K6, T4.3K7, T4.3K8.1, T4.3K8.2, T4.3U5, T4.3U6 và 1 dòng tự nhiên T4.3. Liều tiêm cho mỗi con cá là 0,2 ml canh khuẩn chứa  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU/ml.

Cá thí nghiệm được nuôi trong điều kiện tương tự với điều kiện tự nhiên, thời gian theo dõi là 30 ngày. Kết quả tiến hành gây nhiễm thực nghiệm cụ thể ở bảng 4.

**Bảng 4. Kết quả gây nhiễm cho cá mú sau 15 ngày tiêm các dòng *P. damsela* đột biến**

STT	Dòng vi khuẩn	Liều gây nhiễm (CFU/ml)	Số cá thí nghiệm (con)	Số cá sống sót (con)	Số cá chết (con)	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ sống sót (%)	Thời gian chết (ngày)
1	T4.3 (LD50= $10^{4,3}$ CFU/ml)	$10^4$	30	2	28	93,33	6,67	3-7 ngày
		$10^5$	30	1	29	96,67	3,33	3-7 ngày
		$10^6$	30	0	30	100,00	-	3-7 ngày
2	T4.3K6	$10^4$	30	21	9	30,00	70,00	7-10 ngày
		$10^5$	30	18	12	40,00	60,00	7-10 ngày
		$10^6$	30	11	19	63,33	36,67	5-8 ngày
3	T4.3K7	$10^4$	30	22	8	26,67	73,33	8-10 ngày
		$10^5$	30	21	9	30,00	70,00	8-10 ngày
		$10^6$	30	15	15	50,00	50,00	8-10 ngày
4	T4.3K8.1	$10^4$	30	25	5	16,67	83,33	8-10 ngày
		$10^5$	30	24	6	20,00	80,00	8-10 ngày
		$10^6$	30	21	9	30,00	70,00	8-10 ngày
5	T4.3K8.2	$10^4$	30	28	2	6,67	93,33	8-15 ngày
		$10^5$	30	25	5	16,67	83,33	8-15 ngày
		$10^6$	30	25	5	16,67	83,33	8-20 ngày
6	T4.3U5	$10^4$	30	26	4	13,33	86,67	8-10 ngày
		$10^5$	30	23	7	23,33	76,67	8-10 ngày
		$10^6$	30	22	8	26,67	73,33	8-10 ngày
7	T4.3U6	$10^4$	30	28	2	6,67	93,33	18-20 ngày
		$10^5$	30	28	2	6,67	93,33	18-20 ngày
		$10^6$	30	27	3	10,00	90,00	15-18 ngày
8	Nước sinh lý	0	30	30	0	-	100,00	

Nhìn chung, các dòng đột biến đều giảm độc lực đáng kể so với chủng giống gốc. Với các liều gây nhiễm là  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU/ml (tương ứng với 1-100LD50), chủng tự nhiên T4.3 gây chết với tỷ lệ lần lượt là 93,33%, 96,67% và 100%. Cá chết nhanh trong vòng 3-7 ngày, có các biểu hiện đặc trưng của bệnh tụ huyết trùng do vi khuẩn *P. damsela* gây ra như: cá biếng ăn, hoạt động bơi bị rối loạn. Cơ

thể có màu đen, đặc biệt ở vùng lưng và trên các vết thương tổn da, vây có thể sưng lên và bị lở loét, mang nhợt nhạt, mắt lồi, đục, lớp cơ dưới da có nhiều sắc tố melanin màu đen và thể hiện dấu hiệu hoại tử, có hiện tượng lở loét của lớp biểu bì. Lách, gan, thận bị hoại tử, vết hoại tử này lan nhanh, hoá lỏng và lách sẽ có màu đỏ anh đào, rồi mất dần hình dạng ban đầu của nó, gan chuyển từ màu xám nâu thành màu vàng.

Các cơ quan bên trong khoang bụng xuất huyết, tìm xuất hiện các vết nâu đen.

So sánh độc lực của 6 dòng đột biến, chúng tôi nhận thấy 2 dòng: T4.3K8.2, T4.3U6 là an toàn hơn so với 4 dòng còn lại: tỷ lệ cá sống sót sau khi gây nhiễm với các liều  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  CFU/ml của dòng T4.3K8.2, T4.3U6 tương ứng là: 93,33%, 83,33%, 83,33% và 93,33%, 93,33%, 90%. Thời gian gây chết cá của các dòng này là 8-20 ngày. Cá chết có các biểu hiện biếng ăn, mang nhợt nhạt, mắt lồi, đục, xuất huyết rải rác trên vây.

Như vậy, từ kết quả thu được của các thí nghiệm gây đột biến và đánh giá mức độ giảm độc lực, chúng tôi đã xác định được 2 dòng vi khuẩn giảm độc lực, đó là dòng: T4.3K8.2, và T4.3U6.

#### IV. KẾT LUẬN

Từ chủng vi khuẩn gốc (T4.3) *Photobacterium damsela* bằng phương pháp gây đột biến thực nghiệm dùng rifampicin và tia UV qua các đời sử dụng có biểu hiện biến đổi hình thái vi khuẩn và giảm độc lực. Kết quả đã tạo ra 6 dòng đột biến là T4.3K6, T4.3K7, T4.3K8.1, T4.3K8.2, T4.3U5 và T4.3U6. Đánh giá mức độ giảm độc lực cho thấy 2 dòng vi khuẩn giảm độc lực, có thể sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất vacxin, đó là dòng: T4.3K8.2 và T4.3U6.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Botella S., Pujalte M.-J., Maciasn M.-C., Hernandez J. and Garay E. (2002). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 93, Issue 4, 681–688.
2. Fouz B., Toranzo, A.E., Millan, M. & Amaro, C. (2000). Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*. *Journal of Applied Microbiology* 88: 531-535.

3. Đỗ Thị Hòa, Bùi Quang Tề, Nguyễn Huy Dũng, Nguyễn Thị Muội (2004). Bệnh học thủy sản. NXB Nông Nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh.
4. Lê Thanh Hoà (2006), Y – Sinh học phân tử (Quyển 1). Nhà xuất bản Y học. Hà Nội.
5. Labella A., C. Berbel, M. Manchado, D. Castro and J. J. Borrego (2011). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen affecting new culture marine fish species in Southern Spain. *Archives of virology* 142, 2345-2364.
6. Laganas Pasqualina, Gabriella Caruso, Eleonora Minutoli, Renata Zaccone, Santi Delia (2011). Susceptibility to antibiotics of *Vibrio spp* and *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* strains isolated from Italian aquaculture farms. *The new microbiologica* 34, 1/2011, 53-63.
7. Trần Phước Linh (2008), “Phương pháp phân tích vi sinh vật”, Nhà xuất bản giáo dục.
8. Osorio C. R., Romalde J. L., Barja J. L., Toranzo A. E. (2000). Presence of phospholipase D (dly) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microb. Pathol.* 28:119–126.
9. Rajan P.R., J.H.-Y. Lin, M.-S. Ho and H.-L. Yang (2003). Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* by a PCR technique and plating method. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1375–1380.
10. Romalde Jesu’s L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol* 5: 3–9.

Nhận ngày 18-10-2016

Phản biện ngày 18-11-2016