

KHẢO SÁT ĐỘC LỰC VÀ KHẢ NĂNG GÂY BỆNH XUẤT HUYẾT CỦA *Vibrio alginolyticus* TRÊN CÁ HỒNG MỸ (*Sciaenops ocellatus*) NUÔI LỒNG VÙNG VEN BIỂN THÀNH PHỐ HUẾ

Phạm Thị Hải Yến, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Nguyễn Quang Linh*

Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Tác giả liên hệ: nguyenquanglinh@huaf.edu.vn

Nhận bài: 22/11/2025 Hoàn thành phản biện: 08/01/2026 Chấp nhận bài: 15/01/2026

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm khảo sát độc lực của các chủng *Vibrio* mang các gen độc tố (*toxR*, *tlh*, *tdh*, *trh*) phân lập từ cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) bị bệnh xuất huyết. Đồng thời, khả năng gây bệnh thực nghiệm của các chủng *Vibrio alginolyticus* được đánh giá trong điều kiện *in vivo*. Kết quả cho thấy bốn chủng *V. alginolyticus* (ký hiệu là YHD7, YVL24, YVL22 và YH44) có hoạt tính caseinase, hemolysin và khả năng di động cao hơn có ý nghĩa thống kê so với chủng không mang gen độc tố (*V. alginolyticus* YHD3) ($p < 0,05$). Giá trị LD₅₀ xác định được ở bốn nhóm thử nghiệm 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. Trong số đó, chủng *V. alginolyticus* YHD7 cho thấy độc lực cao nhất. Cá sau khi được gây nhiễm thực nghiệm đều biểu hiện các triệu chứng lâm sàng tương đồng với cá mắc bệnh ngoài tự nhiên, đặc trưng với tình trạng xuất huyết ở vùng mắt, trên bề mặt cơ thể và các cơ quan nội tạng.

Từ khóa: Bệnh xuất huyết, Cá Hồng mỹ, Độc lực, *Vibrio alginolyticus*

VIRULENCE AND PATHOGENICITY OF *Vibrio alginolyticus* CAUSING HEMORRHAGIC DISEASE IN RED DRUM (*Sciaenops ocellatus*) CULTURED IN MARINE CAGES ALONG THE COASTAL AREA OF HUE CITY

Phạm Thị Hai Yến, Nguyễn Duy Quỳnh Trâm, Nguyễn Quang Linh*

University of Agriculture and Forestry, Hue University

*Corresponding author: nguyenquanglinh@huaf.edu.vn

Received: 22/11/2025 Revised: 08/01/2026 Accepted: 15/01/2026

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the virulence of *Vibrio* strains carrying toxin genes (*toxR*, *tlh*, *tdh*, and *trh*) isolated from red drum (*Sciaenops ocellatus*) exhibiting hemorrhagic disease, and to evaluate the experimental pathogenicity of *Vibrio alginolyticus*. The results showed that four *V. alginolyticus* strains (designated as YHD7, YVL24, YVL22, and YH44) which harbored virulence genes, exhibited significantly higher caseinase, hemolysin, and motility activities compared to the non-toxigenic strain ($p < 0,05$). The LD₅₀ values recorded for the four treatment groups were 6.5×10^5 ; 8.1×10^5 ; 1.7×10^6 , and 1.9×10^6 CFU/mL, respectively, whereas *V. alginolyticus* YHD7 isolate exhibited strongest virulence ability. Fish cultured under artificial infection developed clinical signs indistinguishable from those of naturally diseased fish, typically presenting with distinct hemorrhagic lesions in the eyes, on the body surface, and in multiple internal organs.

Keywords: Hemorrhagic disease, Red drum, Virulence factors, *Vibrio alginolyticus*

1. MỞ ĐẦU

Cá Hồng mỹ (*Sciaenops ocellatus*) là một trong những loài cá biển có giá trị kinh tế, được ưu tiên phát triển trong mô hình nuôi lồng tại khu vực ven biển Việt Nam (Thủ tướng Chính phủ, 2021). Nhờ tốc độ sinh trưởng nhanh, khả năng thích nghi tốt và thịt ngon, loài này được xem là đối tượng tiềm năng trong chiến lược đa dạng hóa nuôi trồng thủy sản ven biển (Boerlage và cs., 2017). Tuy nhiên, trong điều kiện nuôi với mật độ cao, biến động môi trường lớn và quản lý dinh dưỡng chưa thực sự hiệu quả, nhiều dịch bệnh đã xuất hiện, trong đó bệnh xuất huyết do vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra được ghi nhận là phổ biến và gây thiệt hại nghiêm trọng ở các lồng nuôi vùng ven biển tỉnh Thừa Thiên Huế (nay là thành phố Huế) (Yen và cs., 2021).

Trong nhóm vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh trên các loài cá biển nuôi lồng, *Vibrio alginolyticus* được xác định là tác nhân chính gây nên hiện tượng xuất huyết, kèm theo các dấu hiệu hoại tử gan và các cơ quan nội tạng ở cá Hồng mỹ. Nghiên cứu của Yen và cs. (2021) đã phân lập 30 chủng *Vibrio* từ cá bệnh tại vùng nuôi, trong đó *V. alginolyticus* chiếm tỷ lệ cao nhất đạt 83,33%, có đến 25/30 chủng mang từ một đến ba gen độc tố (*tdh*, *trh*, *tlh*, *toxR*). Công bố năm 2019 của Đặng Thanh Long và cs. đã phát hiện gen *thermolabile hemolysin* (*tlh*) trong chủng *Vibrio* phân lập từ khu vực ven thành phố biển Huế, cho thấy sự tồn tại của yếu tố độc lực có khả năng gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ.

Vi khuẩn *V. alginolyticus* có bộ gen đa dạng và chứa nhiều yếu tố di động cùng các gen độc lực liên quan đến hemolysin, độc tố (*tdh*, *trh*) và điều hòa *toxR* (Huang và cs., 2024). Phân tích hệ gen của *V. alginolyticus* cho thấy, loài vi khuẩn này có mức độ đa dạng di truyền cao, chứa nhiều gen liên quan đến độc tố, khả năng bám

đính, di động, hướng động và hệ tiết loại III (T3SS), đồng thời mang các yếu tố di động và gen kháng kháng sinh (β -lactam), làm gia tăng khó khăn hơn trong việc kiểm soát dịch bệnh và nguy cơ xuất hiện chủng có khả năng kháng thuốc mạnh hơn theo thời gian (Huang và cs., 2024). Mặc dù sự hiện diện các gen độc tố như *tlh*, *tdh*, *trh* và *toxR* từ các chủng *V. alginolyticus* cho thấy tiềm năng gây bệnh của *V. alginolyticus*, nhưng điều này không phản ánh đầy đủ mức độ độc lực và khả năng gây bệnh thực tế của vi khuẩn. Chính vì thế, nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá mức độ gây độc và khả năng gây bệnh xuất huyết ở cá Hồng mỹ của các chủng *V. alginolyticus* mang đồng thời nhiều gen độc lực.

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nội dung nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu gồm:

- Đánh giá mức độ độc lực của các chủng *V. alginolyticus* đã được phân lập từ cá Hồng mỹ

- Xác định mức độ cảm nhiễm và liều gây chết 50% (LD₅₀) của cá Hồng mỹ trong thí nghiệm gây nhiễm *in vivo*

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp đánh giá độc lực của các chủng *V. alginolyticus* trong điều kiện *in vitro*

Nguồn vi khuẩn: Bốn chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* được sử dụng gồm: YHD7, YVL24, YVL22 và YHTH44 mang 3 trong số 4 gen độc lực (*toxR*, *tdh*, *tlh* và *trh*) (Yen và cs., 2021) và 1 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* YHD3 không mang gen độc tố (Yen và cs., 2022). Các chủng vi khuẩn được nuôi tăng sinh trong môi trường Tryptic Soy Broth (TSB, Merck, CHLB Đức) có bổ sung 2% NaCl để tiến hành các thí nghiệm.

Khả năng di động của vi khuẩn

Khả năng di động của từng chủng vi khuẩn được kiểm tra theo phương pháp của Natrah và cs. (2011) bằng cách lấy 10 μ L huyền phù vi khuẩn nhỏ vào trung tâm đĩa thạch có chứa môi trường TSB (Merck, CHLB Đức) và 0,3% agar, sau đó ủ ở 28°C trong 24 giờ và đo đường kính di động của vi khuẩn.

Xác định hoạt tính caseinase, hemolysin

Hoạt tính caseinase và hoạt tính hemolysin của các chủng *Vibrio* được đánh giá dựa trên điều kiện nuôi cấy kiểm soát theo quy trình của Natrah và cs. (2011), có điều chỉnh. Mỗi nghiệm thức được thực hiện ba lần lặp lại cho từng loại hoạt tính được khảo sát như sau:

- Để xác định khả năng phân giải casein, lấy 10 μ L huyền phù vi khuẩn được nhỏ lên bề mặt môi trường Tryptic Soy Agar (TSA, Merck, CHLB Đức) bổ sung 4% sữa bột đã tách béo (Woolworths, Ôxtrâyliá). Sau đó, các đĩa thí nghiệm được ủ ở nhiệt độ 28°C trong vòng 48–72 giờ, sau đó đo đường kính khuẩn lạc cùng với vùng thủy phân để đánh giá hoạt tính của caseinase.

- Hoạt tính hemolysin của các chủng vi khuẩn được đánh giá bằng cách nhỏ 10 μ L huyền phù vi khuẩn lên trung tâm đĩa thạch máu chứa 5% máu cừu, sau đó ủ ở nhiệt độ 28°C. Đường kính khuẩn lạc và vùng dung huyết được đo sau 48 giờ.

2.2.2. Phương pháp xác định khả năng gây bệnh trong điều kiện in vivo và liều gây chết 50%

Cá thí nghiệm: Cá Hồng mỹ giống sử dụng trong thí nghiệm có khối lượng trung bình $15,6 \pm 2,6$ g/con (tương ứng chiều dài trung bình $11,7 \pm 0,7$ cm/con), cá được thu từ trại giống Cúc Vy, tỉnh Khánh Hòa. Trước khi tiến hành thí nghiệm, cá được

thuần trong bể xi măng có sục khí liên tục trong 14 ngày, được cho ăn 2 lần/ngày bằng thức ăn công nghiệp (với tỷ lệ 3 - 5 % khối lượng thân). Các chỉ tiêu môi trường được duy trì ổn định trong suốt thời gian nuôi thần dưỡng: nhiệt độ 27-30°C, độ mặn duy trì ở mức 18-20‰. Xác định tình trạng nhiễm *Vibrio* của cá được thực hiện theo mô tả của Phuoc và cs. (2021). Để hạn chế stress cho cá, cá được gây mê trước khi cảm nhiễm bằng dung dịch Aquis (Bayer, Việt Nam) với liều 0,02 mL trên mỗi lít nước.

Chuẩn bị thức ăn: Trong thí nghiệm, cá được cho ăn bằng loại thức ăn công nghiệp có hàm lượng protein $\geq 55\%$ do hãng INVE (Thái Lan) cung cấp. Ngày cho ăn 2 lần (8:00 và 15:00 giờ). Tỷ lệ cho ăn trong thí nghiệm được thiết lập ở mức 2,5% so với khối lượng cơ thể cá nhằm bảo đảm đáp ứng nhu cầu dinh dưỡng và duy trì tốc độ tăng trưởng ổn định

Chuẩn bị vi khuẩn cảm nhiễm: Năm chủng vi khuẩn được sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm (gồm các chủng đã trình bày ở phần nguồn vi khuẩn) được nuôi tăng sinh trong môi trường trường TSB (Merck, Cộng hòa liên bang Đức) có bổ sung 2% NaCl. Quá trình nuôi lắc được tiến hành ở 28°C trong 24 giờ bằng tủ lắc LKLAB (Hàn Quốc) với tốc độ 150 vòng/phút. Sau khi nuôi tăng sinh, mật độ vi khuẩn được xác định thông qua mật độ quang ($OD_{600\text{ nm}}$) trên máy quang phổ UV-VIS (U2900, Hitachi, Nhật Bản) và tiếp tục điều chỉnh bằng nước muối sinh lý vô trùng pha loãng đến giá trị $OD=1$. Sau đó vi khuẩn được pha loãng về các nồng độ 10^5 đến 10^8 CFU/mL để cảm nhiễm cho cá Hồng mỹ.

Bố trí thí nghiệm xác định LD₅₀

Thí nghiệm được triển khai trong các bể nhựa có thể tích 80L, được xử lý khử trùng bằng dung dịch chlorine ở nồng độ 200 ppm, sau đó để khô hoàn toàn trước khi sử dụng. Nước biển được điều chỉnh độ mặn

về mức 20%, sau đó cấp vào bể đến khoảng 2/3 thể tích và duy trì sục khí liên tục trong suốt quá trình thí nghiệm. Thí nghiệm được bố trí gồm 5 nghiệm thức. Trong đó, bốn nghiệm thức được tiêm 0,1 mL huyền phù vi khuẩn *V. alginolyticus* (YHD7, YVL24, YVL22 và YHTH44) với các nồng độ lần lượt từ 10^5 đến 10^8 CFU/mL, như vậy 4 nghiệm thức này sẽ gồm 16 bể; nghiệm thức đối chứng gồm 1 bể được tiêm 0,1 mL dung dịch nước muối sinh lý (0,85% NaCl). Mật độ nuôi 10 con cá Hồng mỹ/bể/nghiệm thức. Cá thí nghiệm được tiêm vào vị trí xoang bụng cá.

Tỷ lệ chết tích lũy được ghi nhận trong vòng 14 ngày. Giá trị LD_{50} được tính toán theo phương pháp của Reed và Muench (1938) theo công thức sau: $LD_{50} = 10^{a-x}$

Trong đó:

a là số lũy thừa mà tại đó vi khuẩn gây cá chết thấp nhất (trên 50%)

x được tính dựa vào công thức: $x = (P_a - 50)/(P_a - P_u)$

P_a là tỷ lệ chết cận trên và P_u là tỷ lệ chết cận dưới của liều gây chết 50%

Tình trạng sức khỏe của cá được theo dõi định kỳ 4 lần mỗi ngày. Những cá thể có biểu hiện bất thường như bơi lơ dờ, xuất

huyết ngoài da hoặc mới chết sẽ được thu thập từ tất cả các nghiệm thức, bao gồm cả nghiệm thức đối chứng. Sau cảm nhiễm, vi khuẩn *V. alginolyticus* được phân lập từ nội quan của cá như gan, thận, não và lách. Vi khuẩn phân lập được tiến hành định danh dựa trên các đặc điểm hình thái, sinh lý và sinh hóa, đồng thời xác định lại bằng bộ kit API 20E của hãng Bio Mérieux (Pháp).

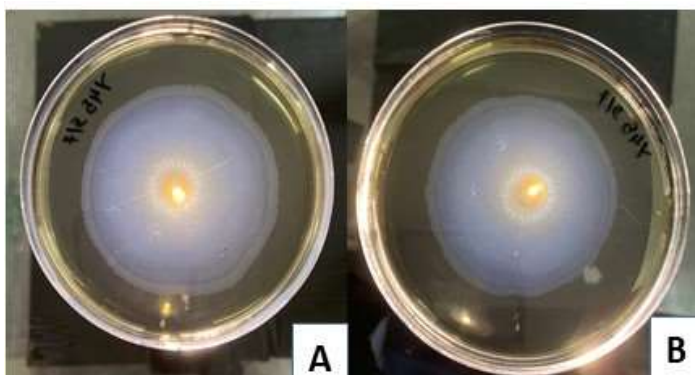
2.2.3. Phương pháp xử lý số liệu

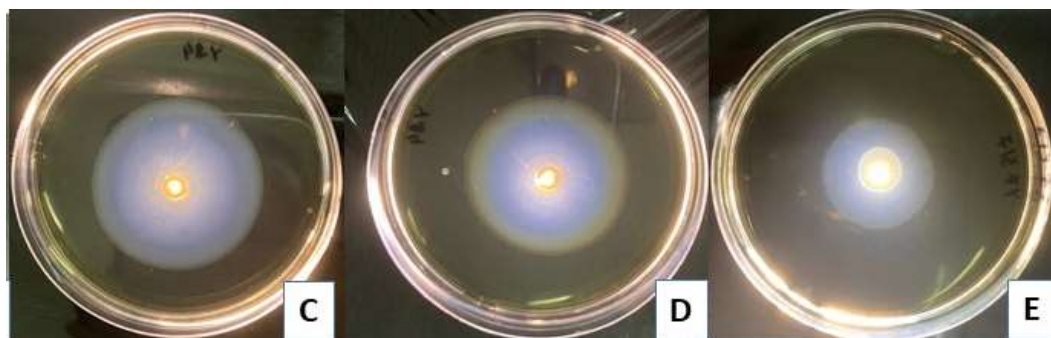
Số liệu được xử lý trên phần mềm Microsoft Excel 2016 và SPSS 16.0, phân tích phương sai một yếu tố (One way ANOVA) để so sánh các hoạt tính (caseinase, khả năng dung huyết và khả năng di động) của các chủng vi khuẩn. Khi kết quả ANOVA cho thấy sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$), phép thử LSD được áp dụng để so sánh giữa các nghiệm thức. Mức ý nghĩa thống kê được xác định ở $p < 0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

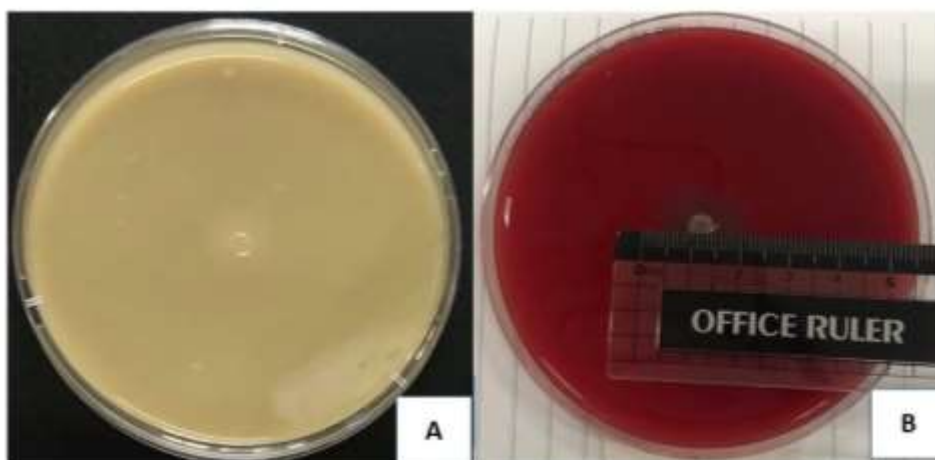
3.1. Kết quả khảo sát độc lực các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* trong điều kiện *in vitro*

Một số yếu tố độc lực của vi khuẩn *V. alginolyticus* như khả năng sản xuất các loại enzyme như caseinase, khả năng dung huyết và khả năng di động được trình bày ở Hình 1&2 và Bảng 1.





Hình 1. Hoạt tính di động của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* (A: YHD7; B: YVL24; C: YVL22; D: YH44; E: YHD3)



Hình 2. Hoạt tính caseinase (A) và khả năng dung huyết (B) của chủng *V. alginolyticus* YHD7

Bảng 1. Các đặc tính gây độc của những chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* trong điều kiện *in vitro*

Chủng	Gen độc tố (Yen và cs., 2021, 2022)	Đường kính vùng hoạt động (mm) (giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn)		
		Caseinase	Di động	Tan huyết
YHD3	-	21,2 $\pm$ 0,25 ^a	32,7 $\pm$ 0,58 ^a	12,7 $\pm$ 0,25 ^a
YVL22	<i>toxR, trh, tlh</i>	27,2 $\pm$ 0,29 ^b	46,2 $\pm$ 0,25 ^b	15,5 $\pm$ 0,15 ^b
YH44	<i>toxR, trh, tlh</i>	27,2 $\pm$ 0,21 ^b	45,9 $\pm$ 0,12 ^b	15,5 $\pm$ 0,06 ^b
YHD7	<i>toxR, tdh, tlh</i>	27,8 $\pm$ 0,25 ^c	50,7 $\pm$ 0,58 ^c	16,8 $\pm$ 0,10 ^c
YVL24	<i>toxR, tdh, tlh</i>	27,7 $\pm$ 0,29 ^c	50,2 $\pm$ 0,29 ^c	16,7 $\pm$ 0,10 ^c

Các chữ cái ^{a, b, c} khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). YHD3: Chủng vi khuẩn không mang gen độc lực, được sử dụng để làm đối chứng.

Bảng 1 cho thấy kết quả thử nghiệm độc lực của 5 chủng *V. alginolyticus*, trong đó bốn chủng có ký hiệu là YHD7, YVL24, YVL22 và YH44 đều mang đồng thời ba gen độc tố (*toxR*, *tlh* và *trh* hoặc *tdh*) thể hiện khả năng sinh caseinase, khả năng di động và hoạt tính dung huyết cao hơn rõ rệt so với chủng YHD3 không mang gen độc tố, sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hoạt tính caseinase: Kết quả đánh giá cho thấy các chủng *V. alginolyticus* mang gen độc tố đều có khả năng sinh caseinase ngoại bào, trong khi chủng đối chứng YHD3 không mang gen độc tố biểu hiện hoạt tính thấp nhất. Trong nhóm các chủng mang gen độc tố, YHD7 và YVL24 là những chủng thể hiện hoạt tính caseinase mạnh hơn so với các chủng còn lại, trong khi YVL22 và YH44 có mức độ hoạt tính tương đương nhau. Điều này cho thấy sự hiện diện của các gen độc tố có mối liên quan với khả năng sinh caseinase của vi khuẩn trong điều kiện *in vitro*. Theo Woo và Bruno (2011) các enzyme ngoại bào như caseinase và gelatinase là những yếu tố độc lực quan trọng của nhiều loài vi khuẩn gây bệnh thuộc chi *Vibrio* và *Aeromonas*, và có mối liên hệ chặt chẽ với cơ chế gây bệnh của chúng.

Khả năng di động: Khả năng di động của các chủng *V. alginolyticus* có sự khác biệt rõ rệt giữa các nhóm. Trong đó, hai chủng YHD7 và YVL24 thể hiện khả năng di động mạnh nhất và không có sự khác biệt đáng kể giữa hai chủng này. Các chủng YVL22 và YH44 có mức độ di động trung bình và tương đương nhau. Ngược lại,

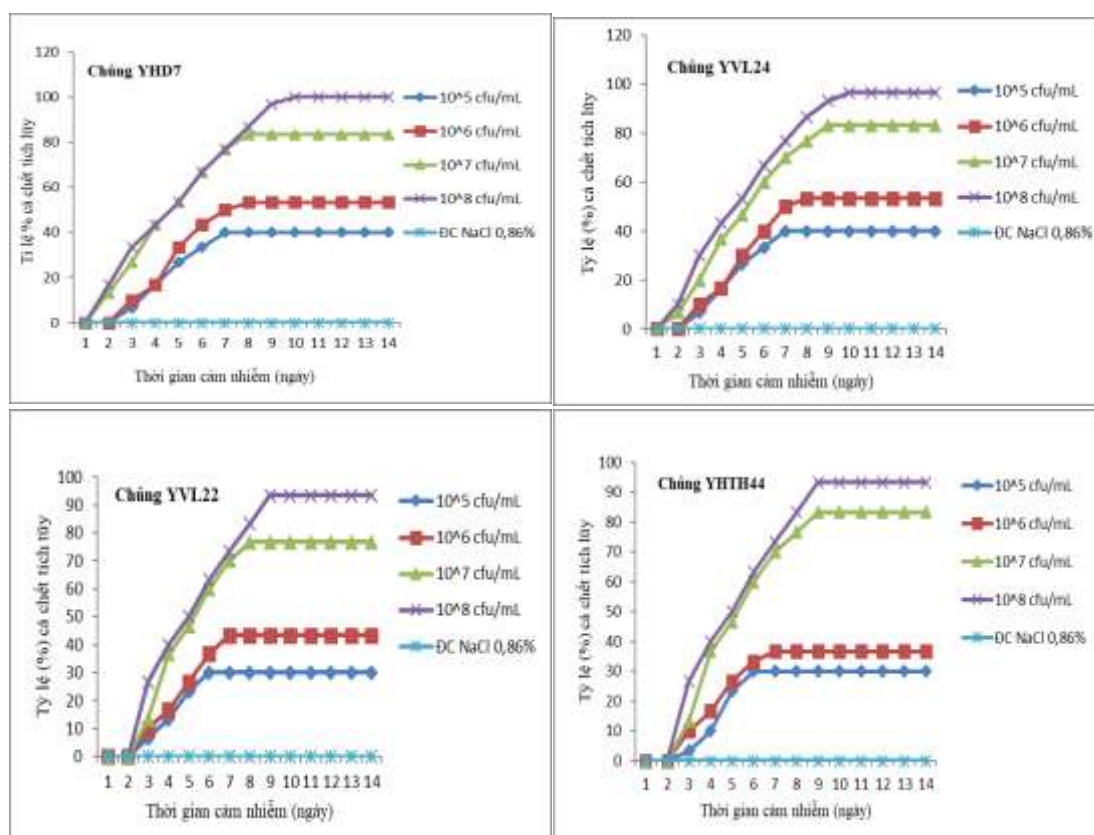
chủng đối chứng YHD3 biểu hiện khả năng di động thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa so với các chủng còn lại. Kết quả này cho thấy các chủng mang gen độc tố có xu hướng biểu hiện khả năng di động cao hơn, phản ánh khả năng xâm nhập và lan truyền mạnh hơn trong điều kiện *in vitro*. Theo Josenhans và Suerbaum (2002), đặc tính di động đóng vai trò quan trọng trong giai đoạn đầu xâm nhập, giúp vi khuẩn tiếp cận và bám dính vào bề mặt của vật chủ.

Hoạt tính dung huyết: Kết quả phân tích hoạt tính dung huyết cho thấy cả năm chủng *V. alginolyticus* đều biểu hiện hoạt tính dung huyết với mức độ khác nhau trên môi trường thạch máu cừu. Tuy nhiên, trong số các chủng khảo sát, YHD3 tạo vòng dung huyết nhỏ nhất; sự khác biệt này thấp hơn so với các chủng còn lại và có ý nghĩa thống kê. YHD7 và YVL24 (là hai trong bốn chủng mang gen độc tố), có vòng dung huyết tương đương nhau và không có sự khác biệt đáng kể giữa hai chủng này, nhưng cao hơn so với hai chủng YVL22 và YH44.

3.2. Mức độ cảm nhiễm và liều gây chết 50% (LD₅₀) của cá Hồng mỹ trong điều kiện *in vivo*

3.2.1. Độc lực của các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* và tỷ lệ chết tích lũy

Độc lực và khả năng gây nhiễm của 4 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* YVL24, *V. alginolyticus* YHD7; *V. alginolyticus* YVL22 và *V. alginolyticus* YH44 trên cá Hồng mỹ ở các nồng độ vi khuẩn khác nhau có tỷ lệ chết tích lũy cũng có sự khác biệt (Hình 3).



Hình 3. Tỷ lệ (%) cá Hồng mỹ chết theo thời gian của bốn chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*

Trong thí nghiệm kéo dài 14 ngày, cá nhiễm cả bốn chủng *V. alginolyticus* bắt đầu xuất hiện tử vong từ ngày thứ 2. Tỷ lệ chết tăng rõ rệt trong khoảng ngày 3–8 và đạt đỉnh vào các ngày 4–6. Từ ngày thứ 9 trở đi, không ghi nhận thêm số cá chết. Ở nghiệm thức đối chứng (cá được tiêm dung dịch nước muối sinh lý), không ghi nhận hiện tượng cá chết trong toàn bộ thời gian theo dõi. Đồng thời, kết quả cho thấy chủng *V. alginolyticus* YHD7 có độc lực mạnh nhất với tỷ lệ chết tích lũy đạt 100%, tiếp theo là

chủng YVL24 (96,67%), trong khi hai chủng YVL22 và YH44 đều có tỷ lệ chết tích lũy 93,33% (Hình 5). Độc lực của các chủng *V. alginolyticus* được đánh giá bằng thí nghiệm gây nhiễm trên cá Hồng mỹ giống. Kết quả xác định giá trị LD_{50} của bốn chủng YHD7, YVL24, YVL22 và YH44 có giá trị dao động trong khoảng từ $6,5 \times 10^5$ đến $1,9 \times 10^6$ CFU/mL (Bảng 2).

Bảng 2. Kết quả giá trị LD₅₀ của 4 chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* trên cá Hồng mỹ

Chủng vi khuẩn	Mật độ vi khuẩn	Số cá thí nghiệm	Số cá chết (con)	Số cá sống (con)	Số cá chết cộng dồn (con)	Số cá sống cộng dồn (con)	Tỷ lệ chết (%)	Giá trị LD ₅₀ (CFU/mL)
YHD7	10 ⁸	10	10	0	27	0	100,00	6,5 x 10 ⁵
	10 ⁷	10	8	2	17	2	89,47	
	10 ⁶	10	5	5	9	7	56,25	
	10 ⁵	10	4	6	4	13	23,53	
YVL24	10 ⁸	10	9	1	26	1	96,29	8,1 x 10 ⁵
	10 ⁷	10	8	2	17	3	85,00	
	10 ⁶	10	5	5	9	8	52,94	
	10 ⁵	10	4	6	4	14	22,22	
YVL22	10 ⁸	10	9	1	23	1	95,65	1,7 x 10 ⁶
	10 ⁷	10	7	3	14	4	77,78	
	10 ⁶	10	4	6	7	10	41,18	
	10 ⁵	10	3	7	3	17	15,00	
YHTH44	10 ⁸	10	9	1	23	1	95,65	1,9 x 10 ⁶
	10 ⁷	10	8	2	14	3	82,35	
	10 ⁶	10	3	7	6	10	37,50	
	10 ⁵	10	3	7	3	17	15,00	

Bảng 2 cho thấy, cả bốn chủng *V. alginolyticus* đều có khả năng gây bệnh và thể hiện độc lực trên cá Hồng mỹ. Giá trị LD₅₀ của các chủng *V. alginolyticus* YHD7, YVL24, YVL22 và YHTH44 đều mang đồng thời 3 trong 4 gen độc tố (*toxR*, *tdh* và *tlh* hoặc *trh*) 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. Trong đó, chủng YHD7 thể hiện độc lực mạnh nhất (LD₅₀ = $6,5 \times 10^5$ CFU/mL), tiếp theo là YVL24 (LD₅₀ = $8,1 \times 10^5$ CFU/mL), YVL22 (LD₅₀ = $1,7 \times 10^6$ CFU/mL) và thấp nhất là YHTH44 (LD₅₀ = $1,9 \times 10^6$ CFU/mL). Kết quả trên cho thấy mức độ gây bệnh của vi khuẩn có thể biến đổi tùy vào tính miễn cảm của từng loài cá (Agnew và Barnes, 2007). Khi nghiên cứu độc lực của *V. alginolyticus* trên cá Bóp (*Rachycentron canadum*), Liu và cs. (2004) đã xác định giá trị LD₅₀ là $3,28 \times 10^4$ CFU/g khối lượng cơ thể; cá xuất hiện các dấu hiệu bệnh lý như bơi lơ dờ, da sẫm màu và bụng trương tương tự với các biểu hiện ở cá nhiễm bệnh ngoài tự nhiên. Tương tự, Sharma và cs. (2013) phân lập được *V. alginolyticus* từ các cơ quan: gan, mang, thận, não và máu của cá Chêm (*Lates*

calcarifer) bị xuất huyết đã xác định được giá trị LD₅₀ là $10^{3,2}$ CFU/g khối lượng cơ thể khi gây nhiễm thực nghiệm. Balebona và cs. (2020) cũng ghi nhận độc lực của *V. alginolyticus* trên cá Tráp bạc (*Sparus aurata* L.) tại Tây Ban Nha có giá trị LD₅₀ dao động từ $5,4 \times 10^4$ đến $1,0 \times 10^6$ CFU/g khối lượng cơ thể. Tại Trung Quốc, trong một nghiên cứu của Xie và cs. (2020), hai chủng vi khuẩn gây bệnh trên cá Ngựa (*Hippocampus kuda*) gồm *V. harveyi* HM12 và *V. alginolyticus* HM14 được ghi nhận có giá trị LD₅₀ lần lượt là $6,067 \times 10^3$ CFU/g và $2,799 \times 10^6$ CFU/g, đồng thời các dấu hiệu lâm sàng quan sát được tương đồng với biểu hiện ở cá nhiễm bệnh trong tự nhiên. Điều này cho thấy nồng độ gây chết của cùng một loài vi khuẩn có thể thay đổi đáng kể tùy thuộc vào loài vật chủ. Ngoài ra, Mmanda và cs. (2014) ghi nhận rằng chủng *Streptococcus iniae* gây bệnh trên cá Hồng mỹ đã xác định giá trị LD₅₀ đạt $9,6 \times 10^6$ CFU/mL. Ngược lại, *V. harveyi* từ cá Hồng mỹ bị viêm ruột tại Đài Loan có giá trị LD₅₀ cao hơn, ở mức $2,9 \times 10^7$ CFU/mL (Liu và cs., 2003). Sự khác biệt này phản ánh biến thiên độc lực giữa các chủng hoặc khác biệt

về mức độ cảm nhiễm của cá thí nghiệm. Bên cạnh đó, mức độ độc lực của vi khuẩn còn chịu ảnh hưởng bởi nguồn gốc phân lập, mức độ miễn dịch của vật nuôi đối với tác nhân gây bệnh, cũng như độ tuổi của cá yếu tố có thể làm thay đổi phản ứng miễn dịch của chúng (Lee, 1995).

3.2.2. Dấu hiệu bệnh lý cá cảm nhiễm và tái định danh vi khuẩn

Từ kết quả gây nhiễm cho thấy, 100% cá ở bốn nghiệm thức đều cảm nhiễm với các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus* (YHD7, YVL22, YVL24, YHTH44) đều

xuất hiện các biểu hiện lâm sàng rõ rệt như cá bơi lơ dờ, trên thân xuất hiện các vết đỏ và dấu hiệu xuất huyết (Hình 4A). Và khi quan sát hình thái giải phẫu cho thấy gan bị xuất huyết, xoang bụng chứa dịch và có mùi hôi đặc trưng (Hình 4B). Những triệu chứng bệnh lý này trên cá Hồng mỹ tương đồng với các mô tả của Rameshkumar và cs. (2017) về cá Bóp (*R. canadum*) giai đoạn giống mắc bệnh lở loét và xuất huyết tại Ấn Độ. Ngược lại, cá ở nghiệm thức đối chứng (tiêm dung dịch nước muối sinh lý) vẫn bơi lội bình thường, không có hiện tượng chết trong suốt 14 ngày thí nghiệm.



Hình 4. Cá Hồng mỹ nhiễm bệnh xuất huyết

A: Xuất huyết ở mắt và xương nắp mang, đuôi bị mòn cụt, xuất huyết; B: xuất huyết nội quan

Kết quả tái phân lập vi khuẩn từ gan và thận của cá Hồng mỹ sau thí nghiệm cảm nhiễm cho thấy các khuẩn lạc mang đặc điểm hình thái đặc trưng của *V. alginolyticus*. Cụ thể, khuẩn lạc xuất hiện

màu vàng trên môi trường TCBS (Hình 5A); màu trắng đục trên môi trường TSA bổ sung NaCl (TSA+) (Hình 5B); và chuyển màu trắng đặc trưng trên môi trường Chromagar (Hình 5C).



Hình 5. Hình dạng khuẩn lạc vi khuẩn *V. alginolyticus* trên môi trường nuôi cấy

(A: môi trường TCBS, B: môi trường TSA+, C: môi trường Chromagar)

Đồng thời, kết quả phân tích hình thái cho thấy vi khuẩn phân lập có dạng dấu phẩy và bắt màu hồng, Gram âm (100×). Kết quả tái định danh bằng bộ kit API 20E, các chủng vi khuẩn thu nhận được có đặc tính sinh hóa (Bảng 3) phù hợp với đặc điểm của *V. alginolyticus* đã từng được phân lập từ cá Hồng mỹ mắc bệnh xuất huyết tại các

lồng nuôi ven biển khu vực thành phố Huế và các biểu hiện bệnh lý trên cá sau khi cảm nhiễm thực nghiệm trong nghiên cứu này hoàn toàn trùng khớp với các triệu chứng bệnh đặc trưng quan sát được trên cá Hồng mỹ mắc bệnh ngoài tự nhiên (Yen và cs., 2021).

Bảng 3. Một số đặc tính sinh hóa các chủng vi khuẩn *V. alginolyticus*

Chi tiêu	<i>V. alginolyticus</i> (Buller, 2004)	Chủng vi khuẩn <i>V. alginolyticus</i> tái phân lập	
		Dương tính	Âm tính
Nhuộm Gram	-		100
Hình thái	Dấu phẩy		Dấu phẩy
Khuẩn lạc trên TCBS	Vàng		Vàng
Khuẩn lạc trên TSA+	ND		Trắng sữa
API 20E	414725		414725
Oxidase	+	100	0
Catalase	+	100	0
Sinh H ₂ S	-	0	100
Phân giải NO ₃	+	100	0
Indol	-	0	100
Voges-Proskauer	+	100	0
Sử dụng Citrate	+	100	0
Glucose	+	100	0
Mannitol	+	100	0
Sorbitol	+	100	0
Sucrose	+	100	0
Arabinose	-	0	100

Phản ứng dương tính: “+”; phản ứng âm tính: “-”; không thực hiện: ND.

Kết quả tái phân lập vi khuẩn sau cảm nhiễm cho thấy sự xuất hiện của *V. alginolyticus* trên cá có biểu hiện bệnh xuất huyết, trong khi không ghi nhận sự hiện diện của vi khuẩn này ở nhóm đối chứng không cảm nhiễm. Các chủng vi khuẩn tái phân lập thể hiện đặc điểm sinh hóa tương đồng với chủng gây nhiễm ban đầu và đáp ứng đầy đủ các tiêu chí của định đề Koch (1876) trong việc chứng minh mối liên quan giữa vi khuẩn và biểu hiện bệnh lý trên cá thí nghiệm. Kết quả này cho thấy các chủng *V. alginolyticus* được khảo sát có khả năng gây bệnh thực nghiệm trên cá Hồng Mỹ trong điều kiện *in vivo*.

4. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng bốn chủng *V. alginolyticus* mang gen gây bệnh xuất huyết trên cá Hồng mỹ có khả năng di động tốt và thể hiện hoạt tính enzyme thủy phân như caseinase và haemolysin mạnh hơn so với các chủng không mang gen gây bệnh.

Kết quả khảo sát ban đầu cho thấy chủng *V. alginolyticus* ký hiệu YHD7 có giá trị LD₅₀ đạt $6,5 \times 10^5$ CFU/mL, thấp hơn so với các chủng YVL24 ($8,1 \times 10^5$ CFU/mL), YVL22 ($1,7 \times 10^6$ CFU/mL) và YHTH44 ($1,9 \times 10^6$ CFU/mL), cho thấy độc lực của YHD7 mạnh hơn rõ rệt, góp phần làm tăng khả năng gây bệnh so với các chủng còn lại.

Những kết quả nghiên cứu này góp phần làm rõ mối liên hệ giữa gen độc tố, các đặc tính sinh học liên quan đến độc lực và khả năng gây bệnh của vi khuẩn *V. alginolyticus*, từ đó cung cấp cơ sở khoa học cho việc xây dựng các biện pháp giám sát và quản lý bệnh xuất huyết trong nuôi cá lồng ven biển.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tài liệu tiếng Việt

Đặng Thanh Long, Nguyễn Thái Hoàng, Hoàng Thị Kim Hồng, Lê Lý Thùy Trâm, Phạm Thị Hải Yến, Huỳnh Văn Chương, Nguyễn Thị Quỳnh Trang và Nguyễn Văn Hiệp. (2019). Phân lập và tạo dòng gene thermolabile hemolysin của vi khuẩn *Vibrio* từ cá Hồng mỹ ở Thừa Thiên Huế. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 128(1E),

- 5–14. DOI: <https://jos.hueuni.edu.vn/index.php/hujos-ns/article/view/5373/736>
 - Thủ tướng Chính phủ. (2021). Quyết định số 1664/QĐ-TTg ngày 04 tháng 11 năm 2021 phê duyệt Đề án phát triển nuôi trồng thủy sản trên biển đến năm 2030, tầm nhìn đến năm 2045.
 - Phạm Thị Hải Yến. (2022). *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)*. Luận án tiến sĩ, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.
- ## 2. Tài liệu tiếng nước ngoài
- Agnew, W., & Barnes, A. C. (2007). *Streptococcus iniae*: an aquatic pathogen of global veterinary significance and a challenging candidate for reliable vaccination. *Veterinary Microbiology*, 122(1–2), 1–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.03.002>
- Boerlage, A. S., Nguyen, K. V., Davidson, J., Phan, V. T., Bui, T. N., Dang, L. T., Stryhn, H., & Hammell, K. L. (2017). Finfish marine aquaculture in northern Vietnam: Factors related to pathogen introduction and spread. *Aquaculture*, 466, 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.09.037>
- Balebona, C., Manuel j. Andreu, M. Angeles bordas, Irene zorrilla, Miguel a, m. i., & Borrego, J. j. (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 64(11), 4269–4275. DOI: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.64.11.4269-4275.1998>.
- Huang, Z., Li, Y., Yu, K., Ma, L., Pang, B., Qin, Q., Li, J., Wang, D., Gao, He., & Kan, B. (2024). Genome-wide expanding of genetic evolution and potential pathogenicity in *Vibrio alginolyticus*. *Emerging Microbes & Infections*, 13(1), 2350164. DOI: <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2350164>
- Josenhans, C., & Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(8), 605–614. DOI: <https://doi.org/10.1159/000324008>
- Koch, R. (1876). Untersuchungen über Bakterien: V. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*” [Investigations into bacteria: V. The etiology of anthrax, based on the ontogenesis of *Bacillus anthracis*]. *Cohns Beitrage zur Biologie der Pflanzen (bằng tiếng Đức)*, 2(2), 277–310.
- Lee, K. K. (1995). Pathogenesis studies on *Vibrio alginolyticus* in the grouper, *Epinephelus malabaricus*, Bloch et Schneider. *Microbial Pathogenesis*, 19(1), 39–48. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0882-4010\(85\)90000-2](https://doi.org/10.1016/S0882-4010(85)90000-2)
- Liu, P., Chuang, W., & Lee, K. (2003). Infectious gastroenteritis caused by *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) in cultured red drum, *Sciaenops ocellatus*. *Journal of Applied Ichthyology*, 19(1), 59–61. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1439-0426.2003.00356.x>
- Liu, P., Lin, J., Hsiao, P., & Lee, K. (2004). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 44(1), 23–28. DOI: <https://doi.org/10.1002/jobm.200310316>
- Miles, A., Misra, S., & Irwin, J. (1938). The estimation of the bactericidal power of the blood. *Epidemiology & Infection*, 38(6), 732–749. DOI: <https://doi.org/10.1017/s002217240001158x>
- Mmanda, F. P., Zhou, S., Zhang, J., Zheng, X., An, S., & Wang, G. (2014). Massive mortality associated with *Streptococcus iniae* infection in cage-cultured red drum (*Sciaenops ocellatus*) in Eastern China. *African Journal of Microbiology Research*, 8(16), 1722–1729.

- Natrah, F., Ruwandeepika, H. D., Pawar, S., Karunasagar, I., Sorgeloos, P., Bossier, P., & Defoirdt, T. (2011). Regulation of virulence factors by quorum sensing in *Vibrio harveyi*. *Veterinary Microbiology*, 154(1–2), 124–129. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.06.024>
- Phuoc, N., Linh, N., Crestani, C., & Zadoks, R. (2021). Effect of strain and environmental conditions on the virulence of *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus; GBS) in red tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture*, 534, 736256. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736256>
- Rameshkumar, P., Nazar, A., Pradeep, M., Kalidas, C., Jayakumar, R., Tamilmani, G., Sakthivel, M., Samal, A. K., Sirajudeen, S., Venkatesan, V., Nazeera, B. M. (2017). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from sea cage cultured cobia (*Rachycentron canadum* (Linnaeus 1766)) in India. *Letters in applied microbiology*, 65(5), 423–430. DOI: <https://doi.org/10.1111/lam.12800>
- Reed, L., & Muench, H. (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American journal of epidemiology*, 27(3), 493–497. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a118408>
- Woo, P., & Bruno, D. (2011). *Fish diseases and disorders. Volume 3: Viral, bacterial and fungal infections* (2nd edition). Wallingford, UK: CABI.
- Xie, J., Bu, L., Jin, S., Wang, X., Zhao, Q., Zhou, S., & Xu, Y. (2020). Outbreak of vibriosis caused by *Vibrio harveyi* and *Vibrio alginolyticus* in farmed seahorse *Hippocampus kuda* in China. *Aquaculture*, 523, 735168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735168>
- Yen, P. T. H., Linh, N. Q., & Tram, N. D. Q. (2021). The identification and determination of toxin genes of *Vibrio* strains causing hemorrhagic disease on red drum (*Sciaenops ocellatus*) using PCR. *AMB Express*, 11(4), 1–11. DOI: <https://amb-express.springeropen.com/articles/10.1186/s13568-020-01161-w>
- Yen, P. T. H., Tram, N. D. Q., & Linh, N. Q. (2022). Isolation and determination of *Vibrio* spp. pathogen from *Sciaenops ocellatus* suffering from hemorrhagic disease under cage culture in Vietnam. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 10(2), 405–415. DOI: <https://jebas.org/ojs/index.php/jebas/article/view/160/191>