

DOI:10.22144/ctu.jsi.2020.006

ẢNH HƯỞNG CỦA ĐỘ MẶN LÊN SỰ Mẫn CẢM CỦA CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*) VỚI VI KHUẨN *Edwardsiella ictaluri*

Tạ Cẩm Tú, Trương Quốc Phú và Đặng Thị Hoàng Oanh*

Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đặng Thị Hoàng Oanh (email: dthoanh@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 18/11/2019

Ngày duyệt đăng: 23/04/2020

Title:

Effect of salinities on the susceptibility of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to *Edwardsiella ictaluri*

Từ khóa:

Edwardsiella ictaluri, độ mặn, *Pangasianodon hypophthalmus*

Keywords:

Edwardsiella ictaluri, *Pangasianodon hypophthalmus*, salinities

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate the susceptibility of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to *Edwardsiella ictaluri*, a causative agent of Bacillary necrosis disease, at different salinities. Experimental striped catfish (25 ± 0.8 g/fish) were randomly stocked at the density of 20 fish/tank (60L in volume) containing freshwater (0ppt) and constant aeration. Salinities in experimental tanks (by a group of 18 tanks) were adjusted to 3, 5, 8, 11 and 14ppt. Seven days after being acclimated to different salinities, fish were challenged by injecting with *E. ictaluri*. After 14 days of post challenge, fish in salinities of 11 and 14ppt were more susceptible to *E. ictaluri* with significantly higher cumulative mortality compared to fish in lower salinities ($P < 0.05$). There was no significant difference among groups exposed to salinities of 0, 3, 5 and 8ppt.

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành để đánh giá tính mẫn cảm của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*, một tác nhân gây bệnh gan thận mủ, ở các độ mặn khác nhau. Cá tra thí nghiệm ($25 \pm 0,8$ g/con) được bố trí ngẫu nhiên với mật độ 20 con/bể (thể tích 60 L) chứa nước (0ppt) và sục khí liên tục. Độ mặn trong các bể thí nghiệm (gồm 18 bể) được điều chỉnh ở 3, 5, 8, 11 và 14 ppt. Cá được thuần dưỡng 7 ngày để thích nghi với các độ mặn khác nhau, sau đó được gây cảm nhiễm bằng phương pháp tiêm liều LD_{50} với vi khuẩn *E. ictaluri*. Sau 14 ngày cảm nhiễm, cá ở độ mặn 11 và 14 ppt dễ mẫn cảm với vi khuẩn *E. ictaluri* và có tỷ lệ chết tích lũy cao hơn có ý nghĩa so với cá ở các độ mặn thấp hơn ($P < 0,05$). Không có sự khác biệt đáng kể giữa các nhóm cá thí nghiệm ở 0, 3, 5 và 8ppt.

Trích dẫn: Tạ Cẩm Tú, Trương Quốc Phú và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2020. Ảnh hưởng của độ mặn lên sự mẫn cảm của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) với vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Thủy sản)(1): 45-51.

1 GIỚI THIỆU

Từ năm 2000, cá tra đã trở thành một trong những đối tượng nuôi chủ lực ở nước ta. Bằng cách áp dụng những tiến bộ về khoa học và kỹ thuật vào

thực tế sản xuất, sản lượng cá tra đã không ngừng được nâng lên và đạt giá trị xuất khẩu là 1,4 tỉ USD vào năm 2010 (De Silva and Phuong, 2011). Tuy nhiên, những năm gần đây nghề nuôi cá tra đã phải

đổi mặt với không ít khó khăn như con giống kém chất lượng, môi trường suy thoái, bệnh xảy ra nhiều làm ảnh hưởng không nhỏ đến sản lượng nuôi. Trong số những mầm bệnh nguy hiểm thường gặp ở cá tra nuôi, vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mũ là một trong những tác nhân đáng chú ý nhất. Bệnh xảy ra quanh năm ở tất cả các lứa tuổi của cá (Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2009). Bệnh do *E. ictaluri* đã gây thiệt hại rất lớn cho ngành công nghiệp nuôi cá da trơn ở Mỹ và Trung Quốc (Arias *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2009). Vào cuối năm 1998, Việt Nam lần đầu tiên phát hiện vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh cá tra vào năm 1998 (Ferguson *et al.*, 2001), tỉ lệ cá tra chết do bệnh này có thể lên đến 60-80% (Crumlish *et al.*, 2002).

Trong những năm gần đây, tác động của biến đổi khí hậu, xâm nhập mặn đã gây ảnh hưởng đến sản xuất nông nghiệp (trong đó có nuôi trồng thủy sản) ở nước ta. Việt Nam được dự báo là một trong năm nước bị ảnh hưởng nặng nề nhất do mực nước biển dâng (Dasgupta *et al.*, 2007). Với tình trạng biến đổi khí hậu và xâm nhập mặn kéo dài, đã có không ít những nghiên cứu về sự ảnh hưởng của độ mặn tác động lên đối tượng nuôi thủy sản, tuy nhiên nghiên cứu sự ảnh hưởng của độ mặn đến bệnh thủy sản nhất là bệnh gan thận mũ ở cá tra còn hạn chế. Trong nghiên cứu này, kết quả về ảnh hưởng của độ mặn lên sự miễn dịch của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* được trình bày nhằm bổ sung thông tin làm cơ sở khoa học cho việc quản lý bệnh trong nuôi cá tra.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Hệ thống thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện tại trại thực nghiệm, Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Cá được bố trí trong bể nhựa có thể tích 60 L. Các bể nhựa được rửa sạch và khử trùng bằng chlorine rồi phơi khô trước khi sử dụng. Nguồn nước sử dụng là nước máy dùng trong sinh hoạt và sục khí liên tục trong suốt quá trình thí

nghiệm. Các dụng cụ được khử trùng bằng chlorine (200 ppm) trước và sau khi kết thúc thí nghiệm.

2.2 Cá thí nghiệm

Cá tra được chọn làm thí nghiệm có trọng lượng $25 \pm 0,8g/con$ và được nuôi dưỡng trong bể có thể tích $1m^3$, cá khỏe, màu sắc tươi sáng, phản ứng linh hoạt. Trước khi tiến hành bố trí thí nghiệm, 10 con cá được chọn ngẫu nhiên kiểm tra ký sinh trùng và phân lập vi khuẩn từ thận để xác định cá không nhiễm hai loại mầm bệnh này.

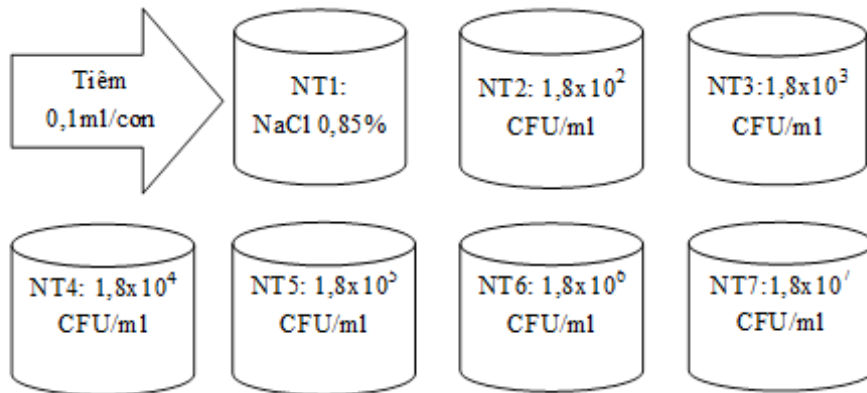
2.3 Chuẩn bị vi khuẩn và gây cảm nhiễm

Chủng *E. ictaluri* CAF258 thuộc bộ sưu tập của Khoa Thủy sản, trường Đại học Cần Thơ được sử dụng để gây cảm nhiễm. Vi khuẩn được phục hồi trên môi trường tryptic soya agar (TSA, Merck) và giữ ở 28 °C trong 24- 48 giờ, sau đó quan sát màu sắc, hình thái khuẩn lạc và nhuộm Gram để xác định tính thuần. Vi khuẩn được nuôi trong môi trường tryptic soya broth (TSB, Merck) trên máy lắc với tốc độ 150 vòng/phút trong 24-48 giờ. Sau đó, cho huyền dịch vi khuẩn vào ống eppendorf tiệt trùng và ly tâm 7500 vòng/phút trong 5 phút. Sau khi ly tâm, phần môi trường được loại bỏ và vi khuẩn được rửa 3 lần bằng nước muối sinh lý (0,85% NaCl) tiệt trùng. Mật độ vi khuẩn được xác định bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc trên môi trường TSA.

2.4 Bố trí và theo dõi thí nghiệm

Thí nghiệm cảm nhiễm thăm dò liều gây chết 50% (LD₅₀) cá thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên (số lượng 10 con/bể và để vài ngày cho cá quen với môi trường trong bể) với 6 nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* với mật độ vi khuẩn khi tiêm từ 10^2 - 10^7 CFU/con và nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối sinh lý (0,85% NaCl) (Hình 1). Cá được gây cảm nhiễm bằng cách tiêm (0,1 ml/con) ở góc vi ngực.



Hình 1: Sơ đồ bố trí thí nghiệm thẩm dò liều LD₅₀

Sau khi tiêm vi khuẩn, biểu hiện của cá được theo dõi trong 14 ngày. Những cá lờ đờ, bơi lội kém linh hoạt được thu để giải phẫu quan sát dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh gan thận mũ. Giá trị LD₅₀ được xác định theo công thức của Reed và Muench (1938): $LD_{50} = 10^{a-p.d}$ (Trong đó: p.d = (L%-50/L%-H%); a: số lữ thừa mà tại đó vi khuẩn gây chết cá thấp nhất nhưng trên 50%; H%: tỷ lệ cá chết cao nhất nhưng dưới 50%; L%: tỷ lệ cá chết thấp nhất nhưng trên 50%). Liều LD₅₀ được sử dụng để gây cảm nhiễm ở thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của độ mặn lên sự miễn cảm của cá tra với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ.

Thí nghiệm xác định ảnh hưởng của độ mặn lên sự miễn cảm của cá tra với vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh gan thận mũ

Cá được bố trí ngẫu nhiên vào bể 60 L với mật độ 20 con/bể, sau đó tiến hành thuần độ mặn bằng cách tăng 2‰/bể/ngày cho tới khi đạt các độ mặn của thí nghiệm. Tổng cộng có 6 nghiệm thức với 3 lần lặp lại, trong đó có 1 nghiệm thức đối chứng là 0‰ và 5 nghiệm thức bố trí cá trong bể với các độ mặn lần lượt là 3‰, 5‰, 8‰, 11‰ và 14‰. Cá sau khi thuần độ mặn cá được gây cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* với liều LD₅₀ và theo dõi trong 14 ngày.

Các chỉ tiêu theo dõi sau cảm nhiễm gồm có: (1) ghi nhận các hoạt động của cá và số cá chết; (2) mổ khám, quan sát và ghi nhận dấu hiệu bệnh bên ngoài và bên trong cơ thể của những con có biểu hiện bệnh lý; (3) tái phân lập vi khuẩn cảm nhiễm trên môi trường TSA bằng cách chọn ngẫu nhiên 1 con cá bệnh/bể, sau đó nhuộm Gram xác định tính thuần và định danh bằng phương pháp PCR bằng đoạn mồi đặc hiệu của vi khuẩn *E. ictaluri*.

2.5 Phương pháp tái phân lập và tái định danh vi khuẩn

Tái phân lập vi khuẩn

Quan sát và ghi nhận dấu hiệu bệnh lý bên ngoài. Dùng kéo tiết trùng giải phẫu cá, quan sát và ghi nhận dấu hiệu bệnh lý bên trong. Dùng dao tiết trùng rạch 1 đường nhỏ ở thận sau, đặt que cấy tiết trùng vào nơi vừa rạch, xoay nhẹ để lấy mẫu bệnh phẩm và cấy trên môi trường TSA. Đĩa cấy được để ở 28°C, sau 24-48 giờ ghi nhận màu sắc, hình dạng khuẩn lạc và tiến hành tách rông đến khi đạt đĩa cấy thuần.

Phương pháp PCR phát hiện *E. ictaluri*

Phương pháp chiết tách DNA: Vi khuẩn được nuôi tăng sinh (48 giờ ở 28°C) trong 5 ml môi trường TSB sau đó chuyển 750 µl dung dịch vi khuẩn sang ống eppendorf mới và cho vào 50 µl dung dịch TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). Hỗn hợp được đun nóng ở 95°C trong 15 phút rồi được làm lạnh nhanh. Ly tâm 2 phút với vận tốc 14.000 vòng/phút để tách dung dịch DNA và bảo quản ở -20°C cho đến khi sử dụng.

Phát hiện *E.ictaluri* bằng phương pháp PCR: Qui trình PCR phát hiện *E. ictaluri* được thực hiện dựa theo qui trình của Panangala *et al.* (2007) (có điều chỉnh theo Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010) gồm 1X dung dịch đệm 5X; 1,5mM MgCl₂; 200 µM dNTPs; 2,5UI TaqDNA polymerase; 0,4 µM mồi xuôi (EiFd-1); 0,4 µM mồi ngược (EiRs-1) và mẫu DNA chiết tách từ vi khuẩn *E. ictaluri*. Điều kiện phản ứng: 95°C trong 4 phút, sau đó thực hiện 95°C trong 30 giây, 55°C trong 45 giây, 72°C trong 30 giây. Lặp lại chu kỳ trong 30 lần, cuối cùng 72°C trong 10 phút.

Điện di và đọc kết quả: Sản phẩm PCR được điện di trên gel 1% agarose (Promega, Mỹ) trong dung dịch đệm TAE 0,5X (10 mM Tris; 5 mM acetate; 0,1 mM EDTA). Kết quả điện di được ghi nhận bằng bàn đọc UV. Căn cứ vào thang DNA chuẩn để xác định trọng lượng phân tử. Sản phẩm khuếch đại đặc hiệu với DNA của vi khuẩn *E. ictaluri* là 407 bp.

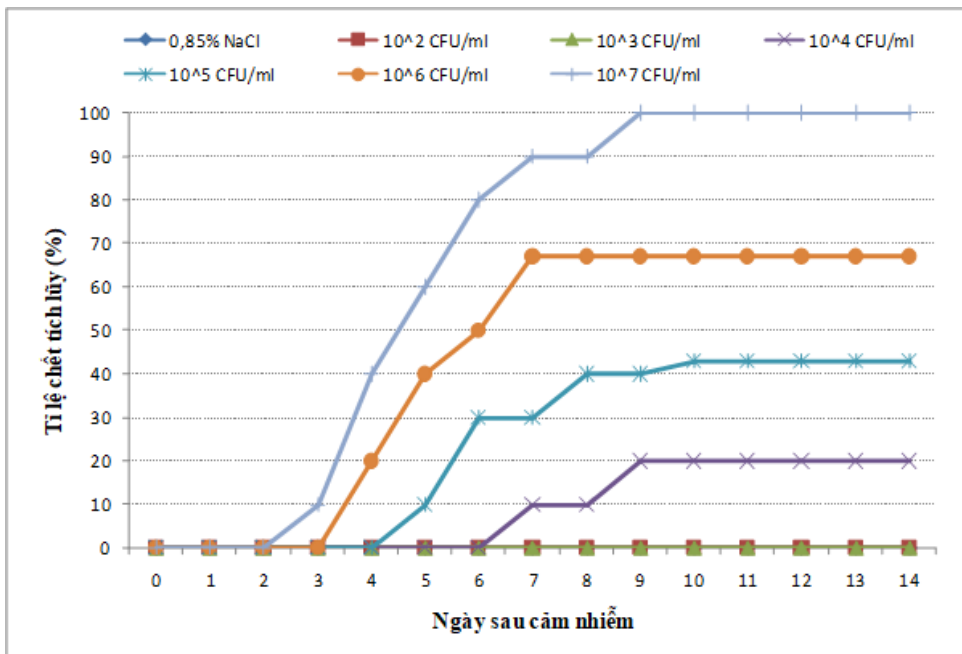
2.6 Phương pháp xử lý số liệu

Sự khác biệt về tỉ lệ chết tích lũy giữa các nghiệm thức thí nghiệm được xử lý thống kê ANOVA 1 nhân tố (ở mức ý nghĩa $P < 0,05$) bằng phần mềm SPSS 16.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Liều gây chết 50% (LD₅₀) cá thí nghiệm

Cá cảm nhiễm có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh gan thận mù (Hình 4C và 4D). Sau ba ngày cảm nhiễm cá bắt đầu chết ở nghiệm thức tiêm 10^7 CFU/con, sớm nhất so với các nghiệm thức còn lại (Hình 2). Ở nghiệm thức tiêm 10^6 CFU/con cá bắt đầu chết vào ngày thứ 4, nghiệm thức tiêm 10^5 CFU/con vào ngày thứ 7 và nghiệm thức tiêm 10^4 CFU/con vào ngày thứ 8 sau cảm nhiễm.



Hình 2: Biểu đồ tỉ lệ cá chết tích lũy của các nghiệm thức sau 14 ngày cảm nhiễm

Sau 14 ngày cảm nhiễm, tỉ lệ chết tích lũy ở các nghiệm thức tiêm 10^4 , 10^5 , 10^6 và 10^7 CFU/con lần lượt là 20%, 30%, 80% và 100%, các nghiệm thức còn lại và nghiệm thức đối chứng tiêm nước muối thì không có cá chết trong suốt quá trình tiến hành thí nghiệm. Giá trị LD₅₀ xác định được là $4,5 \times 10^5$ CFU/ml. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2009) xác định giá trị LD₅₀ của chủng vi khuẩn *E. ictaluri* CAF-06-02 và CAF-06-03 ở cá tra là $1,4 \times 10^5$ CFU/ml và $0,54 \times 10^5$ CFU/ml.

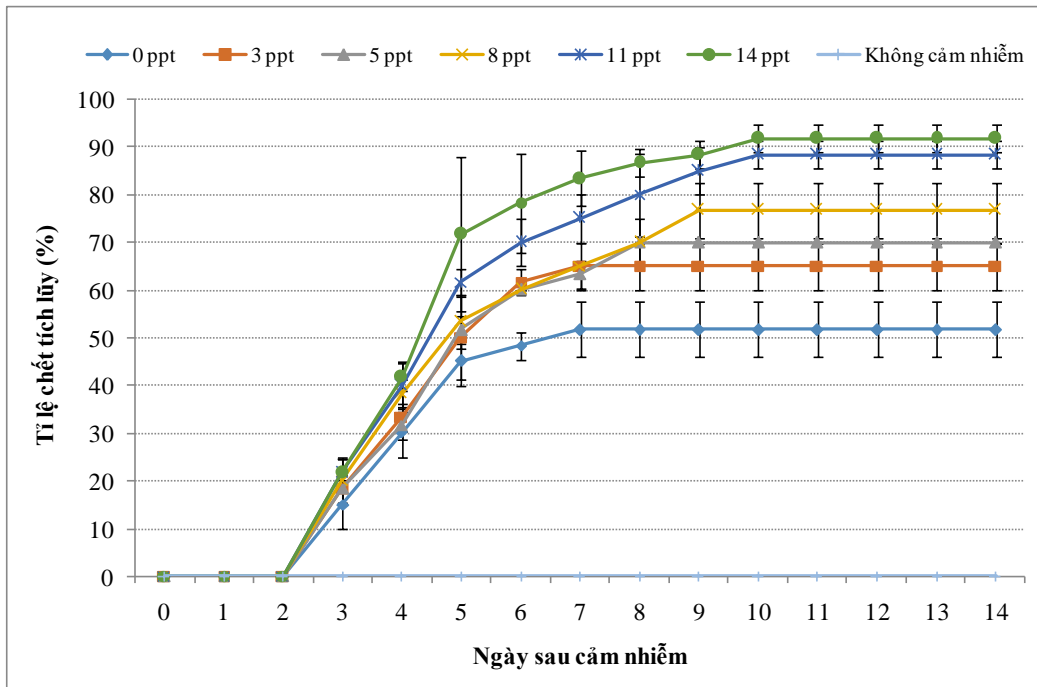
3.2 Ảnh hưởng của độ mặn lên sự miễn cảm của cá tra với vi khuẩn *E. ictaluri*

Thuần hóa độ mặn

Độ mặn trong bể thí nghiệm được thuần hóa cho cá bằng cách tăng 2‰ mỗi ngày cho đến khi đạt được độ mặn cần thí nghiệm, đây được xem là cách thuần hóa độ mặn lý tưởng cho cá vì ít làm ảnh hưởng đến sức khỏe cá (Nguyễn Chí Lâm, 2010). Sau thời gian thuần độ mặn và nuôi dưỡng cá trong bảy ngày, thì ghi nhận không có cá chết ở tất cả các nghiệm thức.

Thời điểm xuất hiện bệnh và tỉ lệ chết tích lũy

Sau 14 ngày thí nghiệm, tất cả các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn đều ghi nhận có cá chết và có dấu hiệu bệnh lý đặc trưng của bệnh gan thận mù. Thời gian xuất hiện bệnh và tỉ lệ cá chết khác nhau ở các nghiệm thức (Hình 3 và Bảng 1).



Hình 3: Biểu đồ tỉ lệ cá chết tích lũy (%) sau 14 ngày cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri*

Sau 14 ngày cảm nhiễm, tỉ lệ chết tích lũy ở nghiệm thức có độ mặn 0‰ là 51,7±5,8% thấp nhất so với các nghiệm thức có độ mặn cao hơn (dao động từ 65,0±5,0 đến 91,7±2,9%). Cá ở hai nghiệm thức độ mặn 11‰ và 14‰ có tỉ lệ chết tích lũy cao (88,3±2,9% và 91,7±2,9%) và khác biệt về tỉ lệ cá chết giữa hai độ mặn này không có ý nghĩa thống kê ($P>0,05$) nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại ($P<0,05$).

Bảng 1: Tỉ lệ cá chết tích lũy (%) của các nghiệm thức sau 14 ngày cảm nhiễm

Nghiệm thức	Tỉ lệ cá chết tích lũy (%)
Độ mặn 0‰	51,7±5,8 ^a
Độ mặn 3‰	65,0±5,0 ^a
Độ mặn 5‰	70,0±0,1 ^a
Độ mặn 8‰	76,7±5,8 ^a
Độ mặn 11‰	83,3±2,9 ^b
Độ mặn 14‰	91,7±2,9 ^b

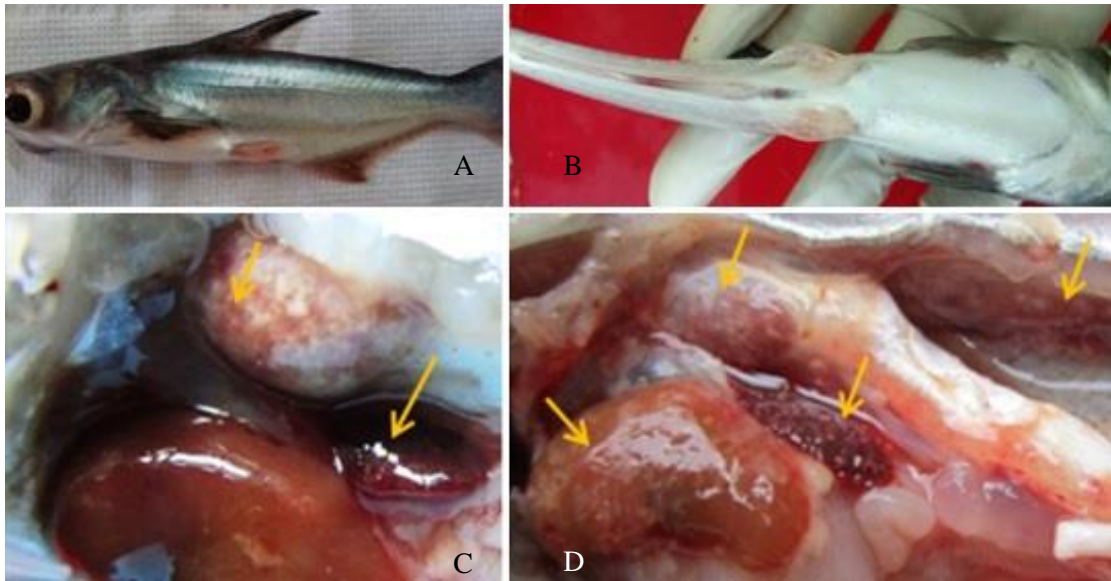
a,b: số liệu trong cùng một cột có ký tự khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$)

Những nghiên cứu được thực hiện trước đây cho thấy độ mặn có ảnh hưởng đến các chỉ tiêu sinh lý, sinh hóa, tốc độ tăng trưởng, tỉ lệ sống và khả năng điều hòa áp suất thẩm thấu (ASTT) của cá tra.

Huong *et al.* (2008), nghiên cứu về độ mặn ảnh hưởng lên sự điều hòa ion của cá tra cho biết điểm đẳng trương của cá là 12‰, cá không thể điều hòa ASTT ở độ mặn >18‰ và cá sẽ chết ở độ mặn 21‰. Cá sẽ điều hòa Na^+ , K^+ và Cl^- ổn định theo thời gian và tăng theo sự gia tăng của độ mặn. Nguyễn Loan Thảo (2013) cho rằng cá giảm tỉ lệ sống đáng kể khi độ mặn tăng hơn 14‰ và sự tăng trưởng giảm rõ rệt so với môi trường nước có độ mặn thấp hơn. Theo Schmitz *et al.* (2016), độ mặn kích thích một số chức năng miễn dịch ở cá tra nhưng việc tiếp xúc lâu dài với tình trạng tăng thẩm thấu quá mức sẽ dẫn đến phản ứng viêm quá mức trong quá trình nhiễm vi khuẩn và gây chết cá.

3.3 Dấu hiệu bệnh lý

Sau 3 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri*, quan sát và ghi nhận được cá bơi lơ đãng, ngứa bụng trên mặt nước sau đó chết và chìm xuống đáy. Bên ngoài cơ thể cá có những biểu hiện như mang nhạt màu, hậu môn sưng, xuất huyết ở các góc vi và hậu môn (Hình 4A và 4B). Tiến hành giải phẫu cá thì thấy trên gan, thận, tỳ tạng có nhiều đốm tròn, nhỏ, màu trắng đục, gan có màu sắc nhợt nhạt, thận sưng, có dịch lỏng trong xoang nội quan (Hình 4C và 4D).



Hình 4: Dấu hiệu bệnh lý bên ngoài và bên trong của cá cảm nhiễm

(A): xuất huyết ở các góc vi; (B): xuất huyết ở hậu môn; (C): đốm trắng ở trên thận và tì tạng, chưa xuất hiện trên gan (mũi tên); (D): đốm trắng trên gan, thận, tì tạng (mũi tên).

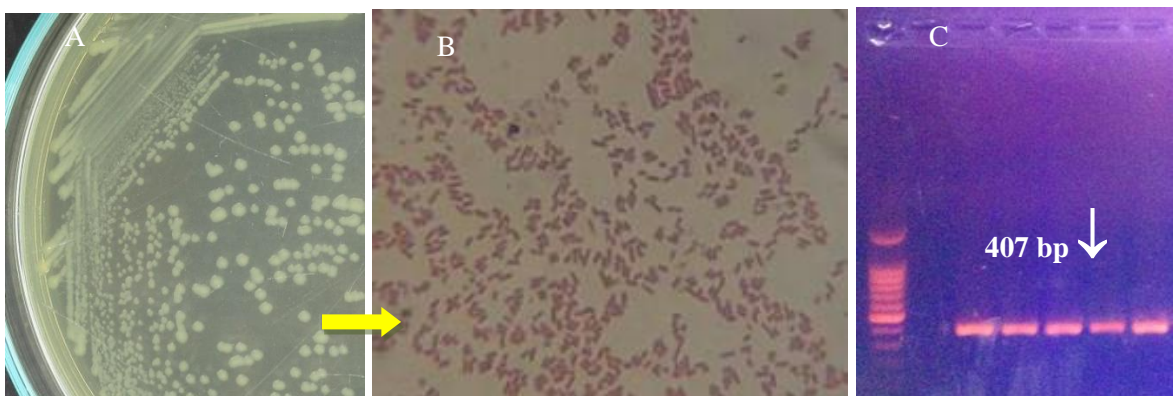
Dấu hiệu bệnh lý của cá gây cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* giống như dấu hiệu bệnh lý của cá nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* ngoài tự nhiên (Ferguson *et al.*, 2001) và cá gây cảm nhiễm vi khuẩn *E. ictaluri* trong điều kiện phòng thí nghiệm của Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương (2009).

3.4 Tái phân lập và định danh vi khuẩn từ cá cảm nhiễm

Vi khuẩn tái phân lập từ thận cá bệnh phát triển trên môi trường TSA sau 36 giờ ở nhiệt độ 28°C có

vi khuẩn lạc màu trắng đục, tròn, lồi, kích thước khoảng 1,5 mm. Vi khuẩn Gram âm, hình que, dương tính với cặp môi đặc hiệu của vi khuẩn *E. ictaluri* (Hình 5).

Đặc điểm này giống với mô tả của nhiều tác giả khi phân lập vi khuẩn *E. ictaluri* gây bệnh ở cá tra (Crumlish *et al.*, 2002; Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010).



Hình 5: Vi khuẩn *E. ictaluri* tái phân lập từ thận cá cảm nhiễm

(A) Khuẩn lạc trên môi trường TSA (sau 48 giờ), (B) Vi khuẩn Gram âm, hình que (100X), (C) gen đặc hiệu của *E. ictaluri* ở vi khuẩn tái phân lập từ thận cá cảm nhiễm.

4 KẾT LUẬN

Độ mặn có ảnh hưởng đến sự miễn cảm của cá tra (cỡ 25 ± 0,8g/con) với vi khuẩn *E. ictaluri* gây

bệnh gan thận mù, ở độ mặn 11‰ và 14‰ cá tra dễ mắc bệnh và chết với tỉ lệ cao. Ảnh hưởng của độ mặn kết hợp với một số chỉ tiêu môi trường khác

như pH và nhiệt độ lên sự miễn dịch của cá tra với vi khuẩn *E. ictaluri* cần được tiếp tục nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài được tài trợ bởi Dự án Hợp tác Kỹ thuật “Tăng cường năng lực trường Đại học Cần Thơ thành trường xuất sắc về đào tạo, nghiên cứu khoa học và chuyển giao công nghệ” của Cơ quan Hợp tác Quốc tế Nhật Bản (JICA).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arias, C.R., Shoemaker, C.A., Evans, J.J. and Klesius, P.H., 2003. A comparative study of *Edwardsiella ictaluri* parent (EILO) and *E.ictaluri* rifampicin-mutant (RE-33) isolates using lipopolysaccharides, outer membrane proteins, fatty acids, biolog, API 20E and genomic analyses. *Journal of Fish Diseases*. 26 (7): 415-421.

Crumlish, M., Dung, T.T., Turnbull, J.F., Ngoc, N.T.N. and Ferguson, H.W., 2002. Identification of *Edwardsiella ictaluri* from diseased freshwater catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), cultured in the Mekong Delta, Vietnam. *Journal of Fish Diseases*. 25(12): 733-736.

De Silva, S.S. and Phuong, N.T., 2011. Striped catfish farming in the Mekong Delta, Vietnam: a tumultuous path to a global success. *Reviews in Aquaculture*. 3(2): 45-73.

Dasgupta, S, B., Laplante, C., Meisner, Wheeler, D. and Yan, J., 2007. The Impact of Sea Level Rise on Developing Countries: A Comparative Analysis. World Bank Policy Research Working Paper 4136, Washington, DC.

Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2009. Độc lực của vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* phân lập từ cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bị bệnh mù gan. *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*. 12:64-70.

Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Trúc Phương, 2010. Phát hiện vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh mù gan trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) bằng phương pháp PCR. *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 13: 151-159.

Ferguson, H.W., Turnbull, J.F., Shinn, A., Thompson, K., Dung, T.T. and Crumlish, M., 2001. Bacillary necrosis in farmed *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) from the Mekong Delta, Viet Nam. *Journal of Fish Diseases*. 24(9): 509-513.

Huong, D.T.T., Phuong, N.T., Wang, T., Thuy, N.H. and Bayley, M., 2008. Osmotic and ionic regulation, food intake and growth of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) exposed to different salinities. *Catfish aquaculture in Asia: present status and challenges for sustainable development*. Handbook & Abstract. 65 pp.

Nguyễn Chí Lâm, 2010. Nghiên cứu sự thích ứng và tăng trưởng của cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*) ở độ mặn khác nhau. Luận văn tốt nghiệp Cao học. Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

Nguyễn Loan Thảo, 2013. Ảnh hưởng của độ mặn lên tăng trưởng và stress của cá tra giống (*Pangasianodon hypophthalmus*). Luận văn cao học. Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

Reed, L.J. and Muench, H., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene*. 27(3): 493-497.

Schmitz, M., Douxfils, J., Mandik, S. N.M., Morana, C., Baekelandt, S., and Kestemont, P., 2016. Chronic hyperosmotic stress interferes with immune homeostasis in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, S.) and leads to excessive inflammatory response during bacterial infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 56: 550-558.

Ye, S., Li, H., Qiao, G. and Li, Z., 2009. First case of *Edwardsiella ictaluri* infection in China farmed yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquaculture* 292(1-2): 6-10.