

NGHIÊN CỨU BIỆN PHÁP THAY THẾ GREEN MALACHITE TRONG ĐIỀU TRỊ TRÙNG QUẢ DƯA *Ichthyophthirius multifiliis*

Trương Đình Hoài^{1*}, Nguyễn Văn Tuyển¹, Nguyễn Thị Hương Giang², Phạm Thị Lam Hồng¹

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

Email*: tdhoai@vnua.edu.vn

Ngày gửi bài: 19.12.2015

Ngày chấp nhận: 20.09.2016

TÓM TẮT

Green malachite và formalin là hỗn hợp hóa chất dùng để đặc trị bệnh trùng quả dưa và các bệnh do ký sinh trùng ở động vật thủy sản. Tuy nhiên, sử dụng Green malachite tiềm tàng nhiều nguy cơ cho môi trường, sức khỏe của người và động vật nên đã bị cấm sử dụng, kéo theo nhiều khó khăn trong việc điều trị loài ký sinh trùng này nói riêng và bệnh động vật thủy sản nói chung. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm hướng tới các phương pháp điều trị mới thân thiện với môi trường, an toàn và hiệu quả. formalin 25 ppm (F25) được kết hợp với hỗn hợp có tính oxy hóa cao PHA (axit peracetic 15%, hydrogen peroxyde 25% và axit acetic 25%) với các nồng độ khác nhau 1, 3, 5, 7, 10 ppm (PHA1, PHA3, PHA5, PHA7, PHA10) được dùng để điều trị thử nghiệm ấu trùng (*in vitro*), trùng trưởng thành (*in vivo*) ký sinh trên cá trắm cỏ và so sánh hiệu quả xử lý với hỗn hợp Fomaline 25 ppm + Green malachite 0,25 ppm (F25 + G0,25). Kết quả thử nghiệm *in vitro* cho thấy dung dịch F25 + PHA10 có thể tiêu diệt 96,5% ấu trùng trong vòng 48 h. Trong thử nghiệm *in vivo*, sau 10 ngày kể từ khi bắt đầu thí nghiệm điều trị, lô gây nhiễm nhưng không điều trị có tỷ lệ cá chết cao (85,56%). Các lô thí nghiệm điều trị bằng hỗn hợp F + PHA có tác dụng tốt trong việc giảm tỷ lệ chết của cá bệnh, trong đó lô cá điều trị bằng hỗn hợp F25 + PHA10 cho tỷ lệ sống 92,23%, tỷ lệ và cường độ nhiễm sau 10 ngày điều trị khá thấp, lần lượt là 5,13% và 1,81 trùng/vi trường, kèm theo sự biến đổi về hình thái và trạng thái hoạt động của trùng quả dưa. Mặc dù hiệu quả điều trị còn chưa triệt để so với hỗn hợp F25 + G0,25 (tỷ lệ sống 94,43%, cá khỏi bệnh hoàn toàn sau 10 ngày đầu điều trị), kết quả theo dõi thêm 10 ngày sau điều trị cho thấy F25 + PHA10 mang lại hiệu quả hồi phục cao, cá ngừng chết và có thể đã tạo miễn dịch chống lại trùng quả dưa một cách hiệu quả.

Từ khóa: Trùng quả dưa, thay thế, green malachite, F + PHA.

Study on Alternative Methods to Green Malachite in Treatment of *Ichthyophthirius multifiliis*

ABSTRACT

The mixture of Green Malachite (MG) and formalin is the most effective chemical used to treat *Ichthyophthirius multifiliis* and other parasites infecting fish. However, MG was prohibited to use in aquaculture due to its potential risks to the environment, animal and human health. The prohibited use of MG has caused many difficulties to treat this parasite and other aquatic diseases. This study was conducted to examine a new, environmental friendly, safe and effectively method alternative to MG. Formalin 25 ppm (F25) was combined with a high oxidizing PHA (15% peracetic acid, 25% hydrogen peroxide and 25% acetic acid) at different concentrations of 1, 3, 5, 7, 10 ppm (PHA1, PHA3, PHA5, PHA7, PHA10) and the mixture was used to experimentally treat theronts (*in vitro*), and mature *Ichthyophthirius multifiliis* (trophonts) parasitized on Grass carp (*in vivo*), following with comparison to mixture of Green malachite and formalin (F25 + G0.25). The *in vitro* test results show that the mixture of F25 + PHA10 could kill 96.5% theronts within 48h. For *in vivo* test, treatments were conducted 72h post infection. After 10 days of experimental treatment, the control group (infected without treatment) had a high mortality rate (85.56%). In contrast, the F25 + G0.25 showed high efficiency in controlling this parasite with 94.43% fish survival. The mixtures F + PHA were effective to mitigate mortality rate compared to the control group, in which the mixture of F25 + PHA10 resulted

in highest survival rate (92.23%), following with low prevalence and infection intensity, 5.13 and 1.81 parasites/sample at 40 x magnification, respectively. In addition, *Ichthyophthirius multifiliis* exhibited changes in morphology and moving behaviour. Results of following 10 days post treatment showed that fish treated with F25 + PHA10 recovered effectively, stopped mortality and probably created immunity against this parasite.

Keywords: *Ichthyophthirius multifiliis*, alternative treatment, green malachite, F + PHA.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trùng quả dưa *Ichthyophthirius multifiliis* là một trong những loài ký sinh trùng nguy hiểm, lây lan nhanh, cá nhiễm bệnh có tỉ lệ chết cao nếu không được can thiệp kịp thời. Bệnh xảy ra trên nhiều đối tượng cá nuôi nước ngọt như cá chép, mè, trôi, trắm, rô phi, trê, basa. Trùng thường ký sinh trên da, mang và các vây. Trùng bám nhiều ở mang và phá hủy lớp tế bào biểu mô nên làm suy giảm chức năng hô hấp, cá bị ngạt nên phải thở gấp. Cá bị bệnh nặng thường chậm chạp, bơi lội lờ đờ và có tỷ lệ chết cao. Trùng quả dưa phát triển qua nhiều giai đoạn, trùng trưởng thành (Trophonts) ký sinh trên cơ thể cá, sau đó các trùng này phát triển và tách ra khỏi cơ thể để hình thành bào nang (Tomonts), các bào nang phát triển theo hình thức phân chia và giải phóng ra môi trường nhiều ấu trùng (Theronts) và tiếp tục gây nhiễm cho cá (Hà Kỳ và Bùi Quang Tề, 2007). Trước đây, malachite green được kết hợp với formalin thành một hỗn hợp hóa chất dùng để điều trị bệnh này và cho hiệu quả điều trị cao. Malachite green là hợp chất hữu cơ, là chất nhuộm màu xanh trong ngành công nghiệp dệt, công nghệ thuộc da. Trong ngành thủy sản trước đây người ta hay dùng chế phẩm Leuco malachite green (dẫn xuất của Malachite), để tẩy uế ao hồ nhằm diệt rong, tảo, nấm, ký sinh trùng (Citek *et al.*, 1997). Loại hóa chất này thường tồn dư lâu trong cơ thể động vật được điều trị và dễ dàng đi vào chuỗi thức ăn mà một lượng nhỏ green malachite tích tụ cũng có khả năng gây ung thư phổi và ảnh hưởng đến máu, tế bào gan ở động vật thí nghiệm và người (Culp và Beland, 1996; Machova *et al.*, 2001; Srivastava *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 2004). Do vậy, hiện nay các nước Mỹ, Anh và nhiều nước châu Âu đã cấm sử dụng chất này trong ngành thủy sản; Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn cũng đã cấm sử dụng chất này; Bộ Y

tế cũng không đưa chất Malachite vào danh mục cho phép sử dụng trong ngành thực phẩm. Các loại hóa chất thông thường như formalin, CuSO₄, NaCl không mang lại hiệu quả trong điều trị mầm bệnh này (Buchmann *et al.*, 2003; Farmer *et al.*, 2013; Miron *et al.*, 2003) và hiện nay chưa có loại thuốc, hóa chất thay cho green malachite nên tình trạng cố tình sử dụng green malachite vẫn còn xảy ra làm ảnh hưởng đến môi trường, sức khỏe động vật và con người.

Hiện nay, vẫn chưa có một giải pháp cụ thể và hữu hiệu để thay thế green malachite trong điều trị bệnh trùng quả dưa. Do vậy, tiếp tục nghiên cứu, thử nghiệm các sản phẩm thay thế khác cho green malachite để vừa có thể xử lý hiệu quả mầm bệnh, vừa đảm bảo vệ sinh an toàn thực phẩm là vô cùng quan trọng và cấp thiết. Axit peracetic, hydrogen peroxyde và axit acetic được biết đến như những hóa chất có tính oxy hóa, thân thiện với môi trường, thời gian phân hủy nhanh và không tồn dư. Axit peracetic và H₂O₂ đã được chứng minh có tác dụng tốt trong việc xử lý tác nhân gây bệnh như vi khuẩn, nấm trong y học và xử lý mầm bệnh trong chất thải, trong khi đó axit acetic đã được ứng dụng để tẩy rửa nấm và xử lý bề mặt nông sản (Baldry, 1983; Dawson *et al.*, 1994; Gehr *et al.*, 2003). Ngoài ra, axit peracetic còn được dùng để rửa bề mặt hoa quả và được đánh giá là có khả năng oxy hóa cao như ozone và mạnh hơn clo. Nghiên cứu này được thực hiện để thử nghiệm hiệu quả điều trị trùng quả dưa bằng sự kết hợp giữa formalin với hỗn hợp các dung dịch có tính oxy hóa cao nói trên ở quy mô phòng thí nghiệm.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Thu mẫu trùng quả dưa

Các mẫu trắm cỏ nhiễm bệnh trùng quả dưa (n = 23) được đưa về phòng thí nghiệm

Bệnh học Thủy sản, trùng quả dưa giai đoạn trophonts được thu từ nhớt da của cá, nhớt được giữ ở nhiệt độ phòng trong 36 - 48 h, theronts nở ra sẽ được pha loãng để thu mẫu chứa dao động từ 5.000 - 7.500 theronts/ml.

2.2. Thu mẫu cá thí nghiệm

Các mẫu cá trắm cỏ sạch bệnh ($n = 720$ con) được thu gom từ các ao cá khỏe mạnh, kiểm tra kỹ không nhiễm trùng quả dưa và bất kỳ loài ký sinh trùng nào khác trước khi gây nhiễm. Cá được cho thích nghi với môi trường bể ương trong phòng thí nghiệm 48h trước khi tiến hành thí nghiệm.

2.3. Hóa chất và công thức pha chế

Các hóa chất được sử dụng gồm formalin đậm đặc (38%) và hỗn hợp PHA bao gồm 3 loại hóa chất có tính oxy hóa gồm axit paracetic 15%, H_2O_2 25% và acetic acid 25%. Chúng tôi tiến hành pha chế thử nghiệm các công thức: Formalin 25 ppm (F25) kết hợp với hỗn hợp PHA ở các nồng độ 1, 3, 5, 7 và 10 ppm (PHA1, PHA3, PHA5, PHA 7 và PHA10). Các hóa chất được tính toán và pha trộn vào 1 lít nước cất ngay trước thời gian thử nghiệm và bổ sung vào các bể nuôi để đạt được các nồng độ điều trị đã định trước.

2.4. Bố trí thí nghiệm

2.4.1. Thí nghiệm *in vitro*

Lấy 20 - 30 μ l dung dịch mẫu theronts (200 - 250 theronts) cho vào các giếng của đĩa 24 giếng microtitre. Sau đó bổ sung các hỗn hợp hóa chất đã pha chế sẵn đủ 1 ml/giếng và đạt các nồng độ cần thử nghiệm để tiến hành xử lý theronts, kèm theo giếng đối chứng không sử dụng hóa chất. Mỗi công thức điều trị được lặp lại 4 lần. Đĩa microtitre được giữ ở nhiệt độ $25^\circ C$ và quan sát hiệu quả xử lý dưới kính hiển vi sau các khoảng thời gian xử lý khác nhau: 0, 1, 12, 24 và 48h. Các theronts bị chết được xác định là những theronts không còn khả năng di động và bị biến đổi về mặt cấu trúc. Theronts trong các giếng được đếm từ trái sang phải, từ trên xuống theo mô tả của Xu *et al.* (2002).

2.4.2. Thí nghiệm *in vivo*

Thí nghiệm được tiến hành trong 21 bể (cỡ 40 x 50 x 60 cm), mỗi bể thí nghiệm chứa 40 lít nước, nhiệt độ nước được duy trì ở mức $25 \pm 0,2^\circ C$ trong suốt thời gian thí nghiệm bằng cách sử dụng các heater nhiệt. Mỗi bể được bố trí 30 cá trắm cỏ hương (cỡ $4 \pm 0,24$ g). Các lô thí nghiệm, cá được gây nhiễm với 5 ml dung dịch nhớt chứa trùng quả dưa giai đoạn theronts. Theo Ventura và Paperna (1985), trùng quả dưa mất khoảng 48 - 72 h để tìm, ký sinh lên da, mang cá và trở thành trophonts trưởng thành, do vậy các thử nghiệm sẽ được tiến hành sau 72h gây nhiễm. Các lô cá được tiến hành xử lý bằng hỗn hợp formalin 25 ppm và PHA ở các nồng độ 1, 3, 5, 7 và 10 ppm. Thời gian mỗi lần ngâm kéo dài 24h, sau đó toàn bộ nước được thay hoàn toàn, cá được ngâm nhắc lại sau mỗi 2 ngày và lặp lại 5 lần. Để tiện so sánh hiệu quả của hỗn hợp đang nghiên cứu với green malachite, chúng tôi tiến hành gây nhiễm và điều trị song song 1 lô cá gây nhiễm bằng formalin + green malachite. Ngoài ra, thí nghiệm có thêm các lô đối chứng 1 (ĐC1) là bể được gây nhiễm nhưng không điều trị và đối chứng 2 (ĐC2) là bể cá không gây nhiễm và không điều trị. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần, điều kiện bể nuôi, chế độ cho ăn, chất lượng nước ở các lô được đảm bảo không có sự khác biệt và trong quá trình điều trị các bể đều được sục khí liên tục. Số lượng cá sống được ghi chép từng ngày, quá trình điều trị kết thúc sau 10 ngày, một nửa số cá ở các lô thí nghiệm và lô đối chứng được kiểm tra cường độ nhiễm và tỷ lệ nhiễm trung bình, số cá còn lại tiếp tục nuôi thêm 10 ngày và kiểm tra khả năng hồi phục của cá sau điều trị.

2.5. Lấy mẫu kiểm tra, tính tỷ lệ và cường độ nhiễm trùng quả dưa

Để tiến hành tính tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm, nhớt trên da cá và mang cá được thu và quan sát với độ phóng đại 10 x 4 theo phương pháp của Hà Ký và Bùi Quang Tê (2007). Mỗi một cá được tiến hành thu 10 mẫu nhớt (5 mẫu da và 5 mẫu mang). Tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm được tính theo công thức:

Tỷ lệ nhiễm = (Tổng số cá bị nhiễm/tổng số cá kiểm tra) x 100

Cường độ nhiễm (Trùng/vi trường) = Tổng số trùng quả dưa đếm được trên các vi trường/Tổng số vi trường có nhiễm trùng quả dưa

2.6. Xử lý số liệu

Số liệu thu được được xử lý bằng phần mềm SPSS 16.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thử nghiệm *in vitro*

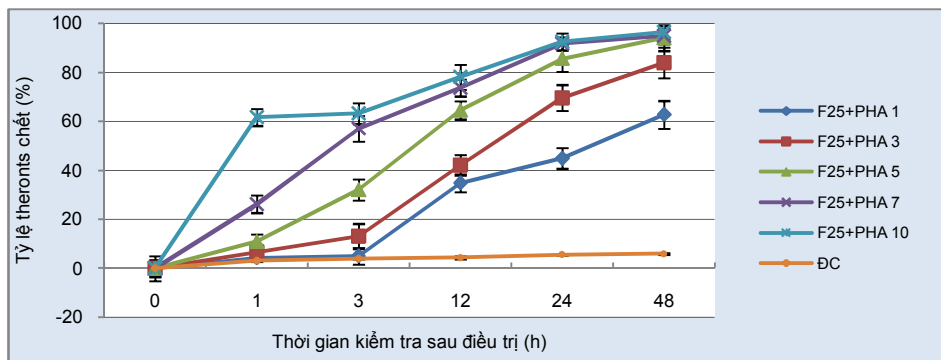
Sau khi xử lý bằng hỗn hợp formalin và PHA ở các nồng độ khác nhau, chúng tôi tiến hành theo dõi sự tồn tại của theronts trong các giếng sử dụng hóa chất điều trị và so sánh với tỷ lệ chết ở các giếng đối chứng. Kết quả thu được sau 0, 1, 3, 12, 24 và 48h theo dõi được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả điều trị bằng hỗn hợp formalin và PHA có tác dụng tốt trong quá trình xử lý các theronts, số lượng theronts còn khả năng di chuyển và có hình thái bình thường giảm đi đáng kể theo thời gian (Bảng 2). Nồng độ hỗn hợp PHA tăng dần có tác dụng tốt hơn trong việc xử lý theronts. Tỷ lệ theronts bị tiêu diệt không còn khả năng di chuyển và bị biến đổi về mặt cấu trúc cao nhất ở liều trình điều trị F25 + PHA5-10, tỷ lệ chết từ 94 - 96,5% sau 48 h điều trị thử nghiệm (Hình 1, 2 và 3). Số lượng theronts sống còn lại bắt đầu chuyển sang giai đoạn tiền trophont. Như vậy, mặc dù hỗn hợp PHA có khả năng tiêu diệt theronts mạnh nhưng chưa triệt để. Do vậy chúng tôi kết thúc thí nghiệm *in vitro* và chuyển sang gây nhiễm bệnh cho cá và tiến hành thí nghiệm *in vivo*, nơi mà trùng quả dưa không những chịu tác động của hóa chất điều trị mà còn có phản ứng miễn dịch từ cơ thể để chống lại mầm bệnh này.

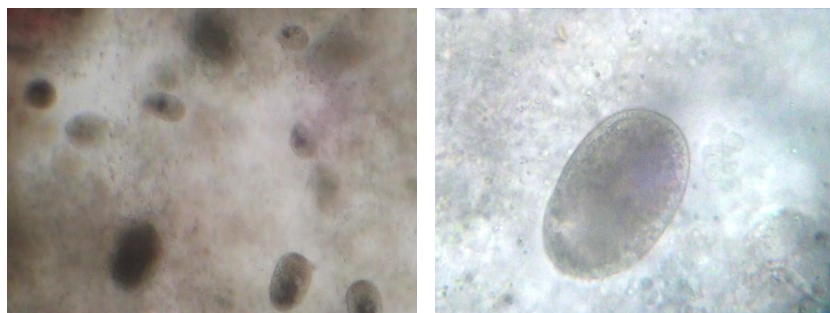
Bảng 1. Kết quả điều trị ấu trùng (theronts) trùng quả dưa *in vitro* bằng hỗn hợp formalin và PHA

Thời gian (h)	Số lượng của theronts sống được điều trị các hỗn hợp hóa chất					Đối chứng (H ₂ O)
	F25 + PHA1	F25 + PHA3	F25 + PHA5	F25 + PHA7	F25 + PHA10	
0	258 ± 7,13	244 ± 8,11	237 ± 10,18	239 ± 9,23	256 ± 10,23	253 ± 10,41
1	247 ± 8,29	228 ± 7,98	211 ± 9,24	191 ± 8,41	98 ± 5,74	245 ± 10,23
3	245 ± 7,89	212 ± 7,25	161 ± 8,44	111 ± 7,29	94 ± 6,13	243 ± 10,27
12	168 ± 9,32	141 ± 9,13	84 ± 6,52	68 ± 5,11	56 ± 4,27	242 ± 10,41
24	142 ± 8,15	74 ± 9,46	34 ± 4,34	21 ± 2,14	19 ± 3,34	239 ± 10,26
48	96 ± 6,78	39 ± 6,55	14 ± 2,17	13 ± 1,65	9 ± 2,11	238 ± 10,17

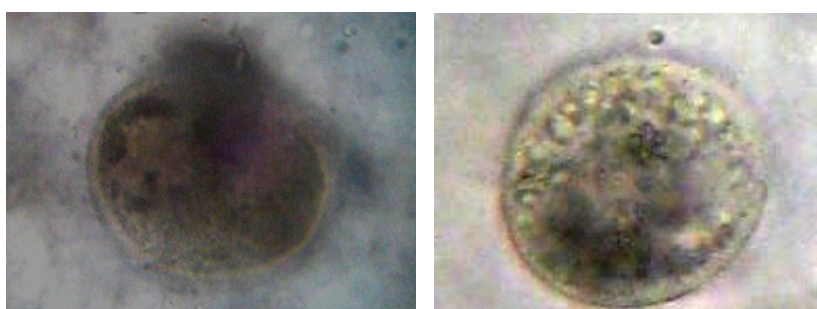
Ghi chú: F25: Formalin 25 ppm; PHA: axit paracetic + hydrogen peroxide + axit acetic



Hình 1. Tỷ lệ theronts chết theo thời gian khi điều trị bằng hỗn hợp formalin + PHA ở các nồng độ so với lô đối chứng



Hình 2. Theronts ở lô đối chứng không điều trị



Hình 3. Theronts mất khả năng di động và biến đổi cấu trúc ở lô thí nghiệm sau 48 h điều trị bằng hỗn hợp formalin + PHA

3.2. Thử nghiệm *in vivo*

Thí nghiệm *in vivo* được chia làm 2 giai đoạn, giai đoạn 1 là thời gian điều trị bằng các hỗn hợp hóa chất, giai đoạn 2 là giai đoạn theo dõi hồi phục và khả năng tự sinh miễn dịch chống lại trùng quả dưa của cá trắm cỏ.

3.2.1. Thí nghiệm giai đoạn 1

a. Tỷ lệ sống của cá

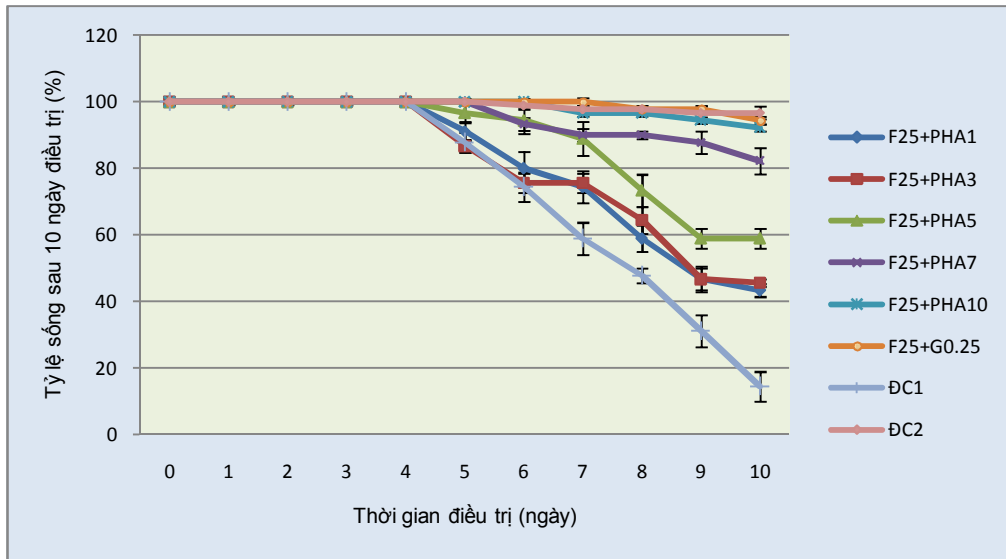
Sau khi gây nhiễm 72h các lô cá bắt đầu được điều trị (ngày 0) và theo dõi số lượng cá trong các lô và tính toán tỷ lệ sống sau 10 ngày. Kết quả về biến động số lượng cá thí nghiệm ở các lô được thể hiện ở Hình 4. Sau 4 ngày gây nhiễm, lô thí nghiệm và lô đối chứng chưa xuất hiện hiện tượng cá chết. Tuy nhiên bắt đầu ngày thứ 5 trở đi (ngày 8 sau gây nhiễm), cá bắt đầu chết ở một số lô. Đặc biệt là ở lô ĐC1 (gây nhiễm và không điều trị), từ ngày thứ 5 đến 10, lượng cá trong bể ĐC1 chỉ còn lại trung bình $4,33 \pm 1,33$ con, tỷ lệ chết cao, lên tới 85,56%. Trong khi đó, lô ĐC2 (không gây nhiễm) tỷ lệ sống của cá cao 96,67%. Như vậy sau 10 ngày, trophonts có thể gây chết một lượng lớn cá nếu không có

sự can thiệp. Ở các lô thí nghiệm, lô cá gây nhiễm bệnh được điều trị bằng F25 + G0,25 cho hiệu quả cao, tỷ lệ chết của cá tương đối thấp (5,57%) và không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với lô ĐC2 (Paired t - test, $p > 0,05$). Trong khi đó, tỷ lệ sống ở các lô cá gây nhiễm có sự khác nhau khi được điều trị bằng hỗn hợp formalin + PHA ở các nồng độ khác nhau, dao động từ 43,3% khi được điều trị bằng F25 + PHA1 và cao nhất là 92, 23% đối với F25 + PHA10. Do vậy, hỗn hợp F25 + PHA10 có tác dụng tốt trong việc hạn chế tỷ lệ chết do trùng quả dưa gây ra trên cá trắm cỏ.

b. Cường độ và tỷ lệ nhiễm trùng quả dưa sau điều trị

Sau 10 ngày đầu tiên điều trị, một nửa số cá còn lại trong các lô thí nghiệm được bắt ngẫu nhiên, lấy mẫu mang, da để kiểm tra tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm. Tổng số lượng cá qua 3 lần thí nghiệm lặp lại, tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm trung bình của cá ở các lô thí nghiệm điều trị và đối chứng thu được ở bảng 2.

Tỷ lệ nhiễm bệnh ở lô ĐC1 là 100% số cá kiểm tra, hầu hết cá đã có biểu hiện đốm trắng



Hình 4. Tỷ lệ sống của cá ở các lô thí nghiệm và đối chứng trong 10 ngày điều trị

Ghi chú: ĐC1: Lô cá được gây nhiễm và không điều trị; ĐC2: Lô cá không gây nhiễm và không điều trị

Bảng 2. Tỷ lệ và cường độ nhiễm của cá sau 10 ngày điều trị

Hỗn hợp pha chế điều trị	Số lượng cá kiểm tra (lần 1, 2, 3)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Cường độ nhiễm Trùng/vi trường
F25 + PHA1	21 (7,8,6)	19,05	9,49 ± 2,3
F25 + PHA3	21 (8,7,6)	14,28	7,57 ± 1,89
F25 + PHA5	24 (9,7,8)	12,50	6,34 ± 1,24
F25 + PHA7	36 (14, 11,11)	8,33	3,76 ± 0,89
F25 + PHA10	39 (14, 12, 13)	5,13	1,81 ± 0,21
F25 + G0,25	42 (14, 13, 15)	0	0
ĐC1	6 (2,1, 3)	100	67,45 ± 4,26
ĐC2	42 (14, 15,13)	0	0

Ghi chú: ĐC1: Lô cá được gây nhiễm và không điều trị; ĐC2: Lô cá không gây nhiễm và không điều trị.

trên thân (Hình 5). Toàn bộ mang và da cá khi kiểm tra đều nhận thấy sự hiện diện dày đặc với mật độ cao của các trophonts trưởng thành, cường độ nhiễm trung bình là 67,5 trùng/vi trường (Hình 6 - 9), cá yếu, ngứa ngáy và khó chịu. Trong khi đó, các lô cá gây nhiễm nhưng được điều trị không thể hiện các triệu chứng nói trên, các đốm trắng không xuất hiện. Lô cá được điều trị bằng formalin + green malachite cho hiệu quả cao, cá được điều trị hoàn toàn (Bảng 2). Tỷ lệ và cường độ nhiễm ở các lô cá cảm nhiễm bệnh giảm dần khi tăng dần nồng độ PHA. Cụ thể ở nồng độ F25 + PHA1, tỷ lệ và cường độ nhiễm của lô cá được điều trị còn khá cao 19,05% và trung bình 9,49

trùng/vi trường. Tuy nhiên khi lô cá được điều trị bằng hỗn hợp F25 + PHA10, tỷ lệ và cường độ nhiễm giảm đi rõ rệt, tỷ lệ nhiễm còn 5,13% và cường độ nhiễm trung bình là 1,81 trùng/vi trường. Mặc dù hiệu quả điều trị của hỗn hợp F25 + PHA10 chưa triệt để so với F25 + G 0,25, nhưng rõ ràng hỗn hợp này có tác dụng rất tốt trong việc giảm tỷ lệ chết của cá và kìm hãm sự phát triển của trùng quả dưa trong các bể nuôi. Ngoài ra, hình thái và cấu trúc của trùng quả dưa ở lô ĐC1 và các lô F25 + PHA 1, 3, 5 có sự khác biệt so với các trùng quả dưa còn sót lại các lô cá được điều trị bằng hỗn hợp F25 + PHA7 và F25 + PHA10. Trong khi trùng ở các lô được điều trị bằng hỗn

hợp F25 + PHA7 và F25 + PHA10 hoạt động yếu, nhân không rõ và có hình thái nhợt nhạt (Hình 8,9), trùng ở lô ĐC1 và hỗn hợp điều trị còn lại hoạt động khá mạnh, nhân hình móng ngựa rõ ràng. Cường độ nhiễm thấp kết hợp với sự thay đổi hình thái và hoạt động, những trùng còn sót lại trên lô cá được điều trị bằng F25 + PHA7 và F25 + PHA10 có thể là những trùng bị cạo ra khi

chúng đang còn ký sinh bị động ở lớp da và mang cá, sự thay đổi hình thái và trạng thái hoạt động yếu là kết quả tác động của hỗn hợp điều trị và có thể đến từ đáp ứng miễn dịch của cơ thể cá, bởi theo một số nghiên cứu, nếu cá nhiễm trùng quả dưa mà vượt qua khỏi, cá có thể miễn dịch với mầm bệnh này trong khoảng 3 - 8 tháng (Hines và Spira, 1974; Houghton, 1987).



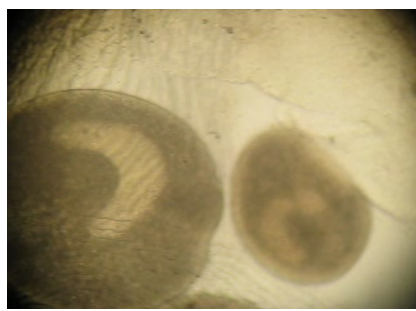
Hình 5. Cá lô ĐC1 không được điều trị biểu hiện đốm trắng trên toàn thân



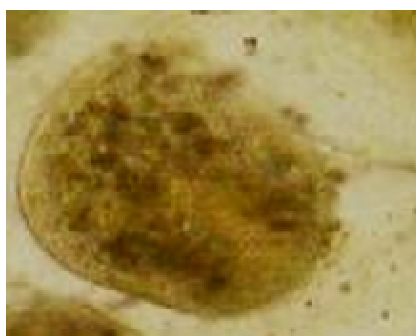
Hình 6. Trùng quả dưa nhiễm dày đặc trên cá



Hình 7. Trophonts trưởng thành di động trên mẫu da cá



Hình 8. Hình thái trùng quả dưa ở lô không được điều trị (ĐC2)



Hình 9. Hình thái trùng quả dưa còn sót lại ở lô thí nghiệm điều trị hỗn hợp F + PHA

3.2.2. Thí nghiệm giai đoạn 2

Theo Paperna (1980), sau khi cá nhiễm trùng quả dưa mà sống sót thì có khả năng sinh miễn dịch trong thời gian dài. Do vậy, theo dõi thêm khả năng sinh miễn dịch và sự hồi phục của cá sau khi bị bệnh là rất cần thiết. Để theo dõi khả năng miễn dịch của cá trắm cỏ với trùng quả dưa, sau khi bắt một nửa số cá kiểm tra ở giai đoạn 1, phần còn lại được tiếp tục nuôi để theo dõi khả năng hồi phục của cá nhiễm bệnh trong 10 ngày tiếp theo. Trong giai đoạn 2, thức ăn của cá ở các lô được bổ sung florphenicol (25 mg/kg cá/ngày) để chống bội nhiễm vi khuẩn (do trùng quả dưa thường làm tổn thương da và mang). Cá được cho ăn 2 lần/ngày vào 9 h sáng và 4 h chiều. Nước được thay 100% sau mỗi 2 ngày. Cá biểu hiện yếu hoặc sắp chết sẽ được vớt ra và tiến hành kiểm tra tình trạng nhiễm trùng quả dưa. Sau 10 ngày theo dõi ở giai đoạn 2, tỷ lệ sống, tỷ lệ nhiễm và cường độ nhiễm thu được ở bảng 3.

Cá ở lô đối chứng 1 tiếp tục chết từ ngày thứ 11 và chết hoàn toàn sau 16 ngày kể từ khi bắt đầu thí nghiệm điều trị, cường độ nhiễm trên da và mang cá rất cao, 69 trùng/vi trường. Trong khi đó, ở lô đối chứng 2, cá vẫn khỏe mạnh và không có sự hiện diện của trùng quả dưa. Ở các lô thí nghiệm, hỗn hợp F25 + G0,25 tiếp tục cho thấy hiệu quả cao, không phát hiện thấy trùng quả dưa trên cơ thể cá. Ở lô thử nghiệm điều trị bằng hỗn hợp thay thế, lô cá được điều trị bằng hỗn hợp F25 + PHA1, F25 +

PHA3 và F25 + PHA5 có tỷ lệ chết và tỷ lệ nhiễm còn khá cao trong khi lô cá được điều trị F25 + PHA7 không còn hiện tượng cá chết, chỉ còn cá nhiễm bệnh với tỷ lệ nhiễm 2,64% (1/38 cá) và cường độ $1,21 \pm 0,28$ trùng/vi trường. Riêng lô cá được điều trị F25 + PHA10 cho thấy khả năng phục hồi cao, không còn phát hiện trùng quả dưa trên cơ thể và cá được điều trị khởi hoàn toàn. Theo Sudová *et al.*, (2010), thời gian phát triển của trophonts và nở ra theronts khoảng 3 - 4 ngày ở nhiệt độ phòng, tuy nhiên kết quả kiểm tra cho thấy không có sự hiện diện của các theronts và trophonts chưa trưởng thành. Như vậy, những trùng quả dưa còn sót lại ở lô đã được điều trị F25 + PHA10 trong vòng 10 ngày đầu ở giai đoạn 1 có thể hoặc không còn khả năng sinh sản do tác dụng của hỗn hợp điều trị hoặc bị tác động từ hệ thống miễn dịch của cơ thể dẫn đến chết, và không tái nhiễm trên cá. Tuy nhiên cần có những nghiên cứu chuyên sâu về miễn dịch của cá với thời gian theo dõi dài hơn để làm rõ vấn đề này.

Một số nghiên cứu đã được tiến hành gần đây để điều trị trùng quả dưa nhằm thay thế green malachite với việc sử dụng riêng rẽ một số hợp chất như formalin, CuSO₄ (Farmer *et al.*, 2013), paracetic acid (Sudová *et al.*, 2010), KMnO₄, chloramine - T, H₂O₂ (Rintamäki - Kinnunen *et al.*, 2005) chưa mang lại hiệu quả rõ rệt. Việc thử nghiệm riêng rẽ axit paracetic, H₂O₂, ở các nồng độ thấp (0,5 - 3 ppm) và trong thời gian ngắn (1 h - 4 ngày) (Sudová *et al.*,

Bảng 3. Tình trạng hồi phục của cá ở giai đoạn 2

Hỗn hợp pha chế điều trị	Số lượng cá ngày 10	Số lượng cá ngày 20	Tỷ lệ chết (%)	Tỷ lệ nhiễm (%)	Cường độ nhiễm (Trùng/vi trường)
F25 + PHA1	18 (7,6,5)	16	11,11	22,22	$9,52 \pm 1,24$
F25 + PHA3	21 (7,6,8)	19	9,52	22,3	$4,27 \pm 1,18$
F25 + PHA5	29 (10,9,10)	27	6,90	13,79	$1,42 \pm 0,14$
F25 + PHA7	38 (13, 13,12)	38	0	2,64	$1,21 \pm 0,28$
F25 + PHA10	45 (13, 11, 11)	45	0	0	0
F25 + G0,25	43 (15, 14, 14)	43	0	0	0
ĐC1	7 (2,2, 3)	0	100	100	$69,38 \pm 5,57$
ĐC2	43 (15, 15,13)	43	0	0	0

2010; Picon - Camacho *et al.*, 2012) là một trong những lý do hiệu quả điều trị mầm bệnh này chưa cao. Ở nghiên cứu sự kết hợp của formalin, axit paracetic, H_2O_2 và axit acetic có thể đã tạo thành một hỗn hợp có khả năng tiêu diệt mầm bệnh cao hơn, kéo dài tác dụng hơn và được điều trị trong thời gian dài hơn đã tạo ra kết quả rõ rệt trong điều trị mầm bệnh này. Dựa vào cơ chế tác động của từng loại hóa chất lên mầm bệnh, có thể sự kết hợp các chất oxy hóa như axit paracetic, H_2O_2 và axit acetic đã tác động mạnh vào màng ngoài và làm rối loạn chuyển hóa ion trong và ngoài màng trùng quả dưa làm bất hoạt trùng, sau đó formalin làm alkyl hóa các nhóm amino và sunhydryl protein, cuối cùng làm trùng bất hoạt và chết. Do vậy kết quả của nghiên cứu này có thể coi như một bước tiến trong quá trình tiến trình tìm kiếm phương pháp thay thế green malachite trong điều trị bệnh trùng quả dưa.

4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Hỗn hợp pha chế formalin + PHA có tác dụng tốt trong việc xử lý bệnh do trùng quả dưa gây ra trên cá trắm cỏ, trong đó hỗn hợp formalin 25 ppm + PHA10 ppm cho kết quả xử lý tốt nhất. Mặc dù hiệu quả xử lý trùng quả dưa của formalin 25 ppm + PHA10 ppm vẫn chưa triệt để so với hỗn hợp formalin và green malachite trong 10 ngày điều trị nhưng kết quả điều trị bước đầu đã hạn chế rất lớn tỷ lệ chết của cá, giảm cường độ nhiễm tới mức thấp, tạo điều kiện và thời gian để cá có những đáp ứng miễn dịch chống lại mầm bệnh và giúp cá hồi phục hoàn toàn sau 20 ngày. Mặc dù cần tiếp tục cải thiện để tối ưu hóa hiệu quả và thử nghiệm ở các mô hình nuôi khác nhau, trong thời điểm này có thể sử dụng hỗn hợp formalin 25 ppm + PHA10 ppm để điều trị bệnh trùng quả dưa thay thế cho green malachite ít nhất là trong các bể ương nuôi giống thủy sản, bể cá cảnh.

4.2. Đề nghị

Cần tiếp tục nghiên cứu và cải thiện phác đồ điều trị để tối ưu hóa hiệu quả của formalin +

PHA trong điều trị trùng quả dưa và ứng dụng điều trị trong các mô hình nuôi, đặc biệt thử nghiệm phối hợp formalin 25 ppm và PHA ở nồng độ cao hơn. Ngoài ra cần xác định liều gây chết LD50 ở các loài cá khác nhau để đánh giá độ an toàn và có cơ sở pha chế sẵn hỗn hợp nhằm điều trị hiệu quả và kịp thời cho từng loài nuôi. Mặt khác, mức độ oxy hóa và thời gian tồn tại của hỗn hợp PHA chịu ảnh hưởng bởi hàm lượng chất hữu cơ và nhiệt độ môi trường nước, do vậy cần có sự nghiên cứu và điều chỉnh nồng độ phù hợp khi điều trị ở những mô hình nuôi khác nhau. Phát triển nghiên cứu và ứng dụng hỗn hợp này trong việc điều trị bệnh nấm ở động vật thủy sản.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn sự giúp đỡ của Bộ môn Môi trường và Bệnh thủy sản, sự cộng tác tích cực từ các sinh viên, trang trại sản xuất giống thủy sản đã tạo điều kiện và hỗ trợ nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Baldry M.G.C. (1983). The bactericidal, fungicidal and sporocidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 54(3): 417 - 423.
- Buchmann K., Jensen P.B. and Kruse K.D. (2003). Effects of sodium percarbonate and garlic extract on *Ichthyophthirius multifiliis* theronts and tomocysts: *in vitro* experiments. *North American Journal of Aquaculture*, 65(1): 21 - 24.
- Citek J., Svobodova Z. and Tesarcik J. (1997). General prevention of fish diseases. *Diseases of Freshwater and Aquarium Fish* (in Czech). Informatorium, Prague, pp. 9 - 49.
- Culp S.J. and Beland F.A. (1996). Malachite green: a toxicological review. *International Journal of Toxicology*, 15(3): 219 - 238.
- Dawson V.K., Rach J.J. and Schreier T.M. (1994). Hydrogen peroxide as a fungicide for fish culture. *Bulletin of the Aquaculture Association of Canada*, 2: 54 - 56.
- Farmer B.D., Fuller S. A., Mitchell A.J., Straus D.L. and Bullard S. A. (2013). Efficacy of bath treatments of formalin and copper sulfate on cultured white bass, *Morone chrysops*, concurrently infected by *Onchocleidus mimus* and

- Ichthyophthirius multifiliis*. Journal of the World Aquaculture Society, 44(2): 305 - 310.
- Gehr R., Wagner M., Veerasubramanian P. and Payment P. (2003). Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. Water research, 37(19): 4573 - 4586.
- Hà Kỳ và Bùi Quang Tề. (2007). Ký sinh trùng cá nước ngọt Việt Nam. Nhà Xuất bản Khoa học và Kỹ Thuật, tr. 10 - 16.
- Hines R.S. and Spira D.T. (1974). Ichthyophthiriasis in the mirror carp *Cyprinus carpio* (L.) V. Acquired immunity. Journal of Fish Biology, 6(4): 373 - 378.
- Houghton G. (1987). The immune response in carp, *Cyprinus carpio* L. to *Ichthyophthirius multifiliis*, Fouquet 1876.
- Machova J., Svobodova Z. and Svobodnik J. (2001). Risk of malachite green application in fish farming - a review. Veterinarstvi (Czech Republic), 51(3): <http://agris.fao.org/>.
- Miron D.S., Silva L.V.F., Golombieski J.I. and Baldisserotto B. (2003). Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* - infected silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. Journal of Applied Aquaculture, 14(1 - 2): 155 - 161.
- Paperna I. (1980). Parasites, infections and diseases of fish in Africa. An update CIFA Technical Paper, Rome, FAO, 31, 220p.
- Picon - Camacho S. M., Marcos - Lopez M., Bron J. E., and Shinn A. P. (2012). An assessment of the use of drug and non - drug interventions in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet, 1876, a protozoan parasite of freshwater fish. Parasitology, 139(02): 149 - 190.
- Rintamäki - Kinnunen P., Rahkonen M., Mannermaa - Keränen A., Suomalainen L., Mykrä H., and Valtonen E.T. (2005). Treatment of ichthyophthiriasis after malachite green. I. Concrete tanks at salmonid farms. Diseases of aquatic organisms, 64(1): 69 - 76.
- Srivastava S., Singh N.D., Srivastava A.K. and Sinha R. (1995). Acute toxicity of malachite green and its effects on certain blood parameters of a catfish, *Heteropneustes fossilis*. Aquatic toxicology, 31(3): 241 - 247.
- Srivastava S., Sinha R. and Roy D. (2004). Toxicological effects of malachite green. Aquatic Toxicology, 66(3): 319 - 329.
- Sudová E., Straus D.L., Wienke A. and Meinelt T. (2010). Evaluation of continuous 4 - day exposure to peracetic acid as a treatment for *Ichthyophthirius multifiliis*. Parasitology research, 106(2): 539 - 542.
- Ventura M.T. and Paperna I. (1985). Histopathology of *Ichthyophthirium multifiliis* infections in fishes. Journal of Fish Biology, 27(2): 185 - 203.
- Xu D.H., Klesius P.H. and Shelby R.A. (2002). Cutaneous antibodies in excised skin from channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque, immune to *Ichthyophthirius multifiliis*. Journal of Fish Diseases, 25(1): 45 - 52.