

DOI:10.22144/ctu.jsi.2018.052

ẢNH HƯỞNG CỦA MÔ HÌNH NUÔI KẾT HỢP TÔM SÚ (*Penaeus monodon*) VỚI RONG CÂU (*Gracilaria* SP.) VÀ CHẾ ĐỘ CHO ĂN LÊN KHẢ NĂNG ĐỀ KHÁNG BỆNH CỦA TÔM

Trần Thị Tuyết Hoa^{1*}, Đinh Thị Ngọc Mai², Hồng Mộng Huyền¹ và Nguyễn Thị Ngọc Anh¹

¹Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

²Sinh viên ngành Bệnh học Thủy sản Khóa 40, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thị Tuyết Hoa (email: ttthoa@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 21/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

Title:

The effect of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*)-red seaweed integrated culture system and feeding rate on the disease resistance of shrimp

Từ khóa:

Đáp ứng miễn dịch, rong câu cước, tôm sú, *Vibrio parahaemolyticus*

Keywords:

Black tiger shrimp, immune response, red seaweed, *Vibrio parahaemolyticus*

ABSTRACT

This study was carried out to determine possible effects on the susceptibility of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to *Vibrio parahaemolyticus* when the shrimp were co-cultured with red seaweed (*Gracilaria* sp.) and fed with different feeding rates. After a 60-day experiment, experimental shrimp was examined the total haemocyte count (THC), the differential haemocyte count (DHC), phenoloxidase (PO) activity and disease resistance to *V. parahaemolyticus*. The results showed that (i) THC, DHC and PO significantly increased in the co-culture treatments; and (ii) the cumulative mortality percentage at 14 days post-infection (dpi) was much lower in the co-culturing treatments (23.3%) than that in the control treatment (63.3%). The results demonstrated that co-culturing black tiger shrimp with red seaweed and variation of feeding rate can induced the immune responses and the survival of *P. monodon* that was challenged with *V. parahaemolyticus*.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá khả năng tác động tích cực của mô hình nuôi kết hợp tôm sú (*Penaeus monodon*) - rong câu (*Gracilaria* sp.) và chế độ cho ăn khác nhau lên khả năng đề kháng vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (*Vibrio parahaemolyticus*) của tôm sú. Sau 60 ngày thí nghiệm, tôm thí nghiệm được xác định các chỉ tiêu tổng tế bào máu (THC), định loại bạch cầu (DHC), hoạt tính enzyme phenoloxidase (PO) và khả năng kháng lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Kết quả ghi nhận (i) tổng tế bào máu, bạch cầu không hạt và hoạt tính PO đều tăng đáng kể ở những nghiệm thức nuôi kết hợp; (ii) tỉ lệ chết tích lũy sau 14 ngày cảm nhiễm ở những nghiệm thức nuôi kết hợp có tỉ lệ thấp hơn (23,3%) so với nghiệm thức đối chứng (63,3%). Kết quả trên cho thấy tôm sú được nuôi kết hợp rong câu và chế độ cho ăn khác nhau giúp tăng cường đáp ứng miễn dịch và tăng tỉ lệ sống cho tôm sú khi cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*.

Trích dẫn: Trần Thị Tuyết Hoa, Đinh Thị Ngọc Mai, Hồng Mộng Huyền và Nguyễn Thị Ngọc Anh, 2018. Ảnh hưởng của mô hình nuôi kết hợp tôm sú (*Penaeus monodon*) với rong câu (*Gracilaria* sp.) và chế độ cho ăn lên khả năng đề kháng bệnh của tôm. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 187-194.

1 GIỚI THIỆU

Tôm sú (*Penaeus monodon*) là đối tượng nuôi truyền thống, được nuôi với nhiều hình thức khác nhau như thâm canh, bán thâm canh, quảng canh,... Tuy nhiên, trong những năm gần đây, nhiều dịch bệnh xuất hiện trên tôm gây thiệt hại nặng nề cho người nuôi, trong đó bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND) làm tôm sú và tôm thẻ chân trắng chết hàng loạt. Cụ thể, năm 2016, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính được ghi nhận xảy ra tại 299 xã của 82 huyện, thị xã thuộc 25 tỉnh với tổng diện tích hơn 6.032,68 ha (Bộ NN&PTNT, 2016).

Hiện nay, để phòng và trị bệnh hoại tử gan tụy cấp tính người nuôi sử dụng ngày càng nhiều hóa chất, kháng sinh (Lê Hồng Phước và *ctv.*, 2011). Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh nhiều sẽ ảnh hưởng tiêu cực, tạo vi khuẩn kháng thuốc kháng sinh, tồn lưu dư lượng kháng sinh (Dung *et al.*, 2008). Do đó, nhiều nghiên cứu được tiến hành nhằm tìm ra một số giải pháp hữu hiệu giúp tôm đề kháng mầm bệnh tăng tỉ lệ sống cho tôm. Ngoài việc phòng bệnh bằng các chế phẩm sinh học hay thảo dược, người nuôi tôm còn ứng dụng các mô hình nuôi kết hợp với cá, lúa hay năng,... để giảm thiểu một số rủi ro về dịch bệnh, tăng tỉ lệ sống cho tôm nuôi hay xử lý môi trường mang lại hiệu quả kinh tế cao cho người nuôi (Huỳnh Quang Năng, 2005).

Trong thời gian gần đây, các hình thức nuôi kết hợp đang được nghiên cứu và áp dụng như là giải pháp phòng bệnh có hiệu quả, đặc biệt là các mô hình nuôi tôm kết hợp với nhiều loài rong biển (Huỳnh Quang Năng, 2005; Izzati, 2011; Ihsan, 2012; Rejeki *et al.*, 2016). Ngoài tác dụng xử lý ô nhiễm dinh dưỡng trong các ao nuôi, rong biển còn có khả năng giúp tăng sức đề kháng, chống stress (Cruz-Suasrez *et al.*, 2010; Tawil, 2010) và kích thích tăng trưởng (Cruz-Suarez *et al.*, 2008), do rong có chứa các hợp chất có hoạt tính sinh học như polysaccharide, sulfated galactans (Sirirustananun *et al.*, 2011).

Giống như các loài rong biển khác, rong câu (*Gracilaria sp.*) là nguồn nguyên liệu dùng cho chiết xuất agar, làm thực phẩm, đặc biệt rong câu được sử dụng trong các mô hình nuôi kết hợp với tác dụng xử lý môi trường nuôi thủy sản (McHugh, 2003; Lê Như Hậu và Nguyễn Hữu Đại, 2007). Đồng thời, rong câu (*Gracilaria sp.*) được ghi nhận có chứa nhiều hợp chất giúp tăng miễn dịch và có thể thay thế một phần thức ăn công nghiệp trong nuôi tôm thẻ chân trắng (Marinho-Soriano *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2012). Ngoài ra, rong câu kết hợp với các loài thủy sản khác sẽ duy trì cân bằng hệ sinh thái, hạn chế dịch bệnh trên nhiều đối tượng thủy sản và mang

lại kinh tế cho người dân. Bên cạnh đó, rong câu được đánh giá như một bộ máy lọc sinh học giúp xử lý nước ao và làm trong nước (Lê Như Hậu và Nguyễn Hữu Đại, 2007). Do vậy, nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của việc nuôi tôm sú kết hợp với rong câu cùng với chế độ ăn khác nhau lên khả năng đề kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính của tôm sú ở điều kiện phòng thí nghiệm.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Đối tượng nghiên cứu

Tôm sú giống dùng cho thí nghiệm cảm nhiễm được nuôi trong thời gian 60 ngày ở điều kiện như sau: tôm sú (0,47-0,49 g/con) được nuôi với mật độ 100 con/m³ trong điều kiện có bổ sung rong câu với tỉ lệ 1 kg/m³ đối với nghiệm thức nuôi kết hợp. Tôm được cho ăn 4 lần/ngày vào 7 h, 11 h, 15 h và 19 h, sử dụng thức ăn công nghiệp (GROBEST) dùng cho tôm sú theo từng giai đoạn với hàm lượng đạm 40-42%. Chế độ thay nước được thực hiện hàng tuần, thay 20% lượng nước trong bể nuôi. Khối lượng rong câu được xác định 15 ngày/lần, bổ sung để duy trì khối lượng ban đầu và thí nghiệm được tiến hành trong 60 ngày.

Rong câu (*Gracilaria sp.*), được thu từ ao nuôi tôm tại tỉnh Cà Mau và được thuần độ mặn trước khi bố trí thí nghiệm ở mật độ 1 kg/m³, đã được xác định hiệu quả cho mô hình nuôi tôm kết hợp với rong (Nguyễn Thị Ngọc Anh và *ctv.*, 2014).

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* dùng cho thí nghiệm cảm nhiễm được chọn từ bộ sưu tập mẫu bệnh của Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

2.2 Bố trí thí nghiệm

Tôm sú sau 60 ngày nuôi kết hợp với rong câu - RC (1 kg/m³) và các chế độ cho ăn khác nhau (cho ăn thỏa mãn nhu cầu (100%), 75% so với nhu cầu, 50% so với nhu cầu và 25% so với nhu cầu thức ăn) được thu mẫu để xác định chỉ tiêu tổng tế bào máu, bạch cầu không hạt và hoạt tính phenoloxidase (PO). Tôm được thu mẫu để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch từ tổng số năm nghiệm thức thí nghiệm với số lượng 6 tôm/nghiệm thức.

Tiếp theo, tôm được cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp ngâm (Tran *et al.*, 2013) với nồng độ đã được xác định cho phép gây chết tôm với tỉ lệ 50%. Tôm ở các nghiệm thức cảm nhiễm được giữ ổn định một ngày trước khi cảm nhiễm. Thí nghiệm cảm nhiễm được bố trí thành sáu nghiệm thức và lặp lại ba lần. Số lượng tôm cho thí nghiệm cảm nhiễm là 30 con/nghiệm thức. Các nghiệm thức cảm nhiễm bao gồm:

Nghiệm thức I: Tôm nuôi đơn - cho ăn thỏa mãn nhu cầu (100%)-cảm nhiễm *V.parahaemolyticus*

Nghiệm thức II: Tôm + rong câu - cho ăn thỏa mãn nhu cầu (100%)-cảm nhiễm *V.parahaemolyticus*

Nghiệm thức III: Tôm + rong câu -cho ăn 75% NTI-cảm nhiễm *V.parahaemolyticus*

Nghiệm thức IV: Tôm + rong câu -cho ăn 50% NTI-cảm nhiễm *V.parahaemolyticus*

Nghiệm thức V: Tôm + rong câu -cho ăn 25% NTI-cảm nhiễm *V.parahaemolyticus*

Nghiệm thức VI: Tôm nuôi đơn - cho ăn theo nhu cầu (100%) -cảm nhiễm nước muối sinh lý.

Ghi nhận các dấu hiệu bệnh lý, tỉ lệ chết của tôm thí nghiệm cảm nhiễm trong vòng 14 ngày. Tôm có dấu hiệu gần chết được thu 6 tôm/nghiệm thức dùng cho phân tích mẫu mô học và phản ứng chuỗi polymerase (PCR).

Tôm cảm nhiễm được cho ăn thức ăn viên công nghiệp, với chế độ 2 lần/ngày và rong câu được bổ sung vào các bể thí nghiệm (1 kg/m³) trong suốt quá trình thí nghiệm cảm nhiễm. Tôm được bố trí trong bể kính 50 lít với độ mặn là 15‰, nhiệt độ dao động từ 28-30°C và được sục khí liên tục.

2.3 Phương pháp phân tích

2.3.1 Chỉ tiêu huyết học

Chỉ tiêu huyết học bao gồm: (i) tổng số tế bào máu (THC) được xác định theo phương pháp của Le Moullac *et al.* (1997). Máu tôm được thu bằng kim tiêm vô trùng có chứa dung dịch chống đông (tỉ lệ 1:9). Mật độ tế bào máu được xác định bằng buồng đếm hồng cầu và quan sát dưới kính hiển vi (40X). (ii) Định loại bạch cầu được xác định dựa trên phương pháp của Cornick và Stewart (1978).

2.3.2 Hoạt tính PO

Hoạt tính PO được xác định dựa trên phương pháp của Hernandez-Lospez *et al.* (1996). Mẫu máu được ly tâm ở 2500 rpm trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi loại bỏ phần dịch nổi, thêm vào 1ml đệm Cacodylate Citrate (pH 7.0) và tiếp tục ly tâm ở tốc độ 2500 rpm, 20 phút, nhiệt độ 4°C. Mẫu tiếp tục được loại bỏ phần dịch nổi và trộn đều với 200 µL đệm Cacodylate Buffer. Mẫu được chia thành hai phần bằng nhau, mỗi phần 100 µL. Một phần được thêm 50 µL dung dịch trypsin (kích hoạt prophenoloxidase); một phần được thêm 50 µL đệm cacodylate (đối chứng). Giữ mẫu ở nhiệt độ phòng trong thời gian 10 phút, tiếp theo thêm vào 50 µL dung dịch L-DOPA, sau đó giữ mẫu ở nhiệt độ phòng (26-28°C) trong thời gian năm phút, sau cùng

thêm vào 800 µL đệm cacodylate, trộn đều mẫu. Đọc kết quả sau một phút ở bước sóng $\lambda = 490$ nm.

2.3.3 Phương pháp mô học

Mẫu tôm được cố định trong dung dịch Davidson's AFA trong 24 giờ sau đó chuyển sang cồn 70°C. Qui trình phân tích mô học bao gồm các bước: xử lý mẫu, cắt tia định hướng, khử nước, đúc khối với parafin, cắt lát mẫu với độ dày 4-8 µm (Lightner, 1996). Sau đó, mẫu được nhuộm với H & E (Hematoxylin và Eosin), gắn lên tiêu bản và đọc kết quả bằng kính hiển vi quang học.

2.3.4 Phương pháp PCR phát hiện *V. parahaemolyticus*

DNA được chiết tách từ mẫu mang tôm, sau đó được sử dụng cho phản ứng PCR phát hiện vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với thành phần hóa chất tham gia phản ứng và điều kiện chu kỳ nhiệt được thực hiện theo phương pháp của Sritunyalucksana *et al.* (2014). Kết quả điện di được ghi nhận bằng máy đọc gel, căn cứ vào thang DNA 100 bp để xác định trọng lượng phân tử, trong đó mẫu có vạch 1269 bp (sản phẩm PCR bước 1) và 230 bp (sản phẩm PCR bước 2) là mẫu nhiễm *V. parahaemolyticus* và mẫu không có vạch sản phẩm là âm tính không nhiễm *V. parahaemolyticus*.

2.3.5 Phương pháp xử lý số liệu

Các số liệu thu nhập được xử lý bằng phần mềm Excel. Sử dụng chương trình SPSS 22.0, phân tích ANOVA 1 nhân tố ở mức ý nghĩa ($p < 0,05$) bằng phép thử Duncan.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của mô hình nuôi kết hợp và chế độ cho ăn lên một số chỉ tiêu miễn dịch của tôm sú

Tổng số tế bào máu: Kết quả thí nghiệm cho thấy chỉ số THC của tôm sú sau 60 ngày thí nghiệm tăng cao nhất ở NTII(100%TA+RC) ($1,23 \times 10^4$ tb/mm³) và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại. Riêng, NTI không bổ sung rong câu ($0,90 \times 10^4$ tb/mm³) có giá trị thấp nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức có bổ sung rong câu, cụ thể NTIII($1,1 \times 10^4$ tb/mm³), NTIV($1,05 \times 10^4$ tb/mm³) và NTV(1×10^4 tb/mm³) (Bảng 1). Kết quả tương tự cũng đã được ghi nhận với các thí nghiệm có bổ sung chiết xuất rong cho tôm qua khẩu phần ăn. Cụ thể, Chang *et al.* (2011) ghi nhận tỉ lệ sống ở nhóm tôm được bổ sung β -glucan tăng 20% so với nhóm tôm đối chứng, chỉ tiêu THC gia tăng đáng kể và được ghi nhận là do β -glucan kích thích hệ miễn dịch thực hiện cơ chế bảo vệ, tế bào bạch cầu thực hiện quá trình melanin hóa, thực bào. Tương tự, Sivagnanavelmurugan *et al.* (2014) xác định bổ

sung hoạt chất fucoidan vào thức ăn của tôm sú với hàm lượng lần lượt là 0,1, 0,2, 0,3% giúp tôm sú chống lại *V. parahaemolyticus*. Trong đó, (i) nghiệm thức không cảm nhiễm với vi khuẩn và không cho ăn thức ăn có bổ sung fucoidan (đối chứng) thì sau 21 ngày chỉ tiêu THC không thay đổi; (ii) nghiệm thức cảm nhiễm với vi khuẩn nhưng không bổ sung hoạt chất fucoidan thì chỉ tiêu THC lại giảm và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm

thức đối chứng; (iii) nghiệm thức cảm nhiễm với vi khuẩn và bổ sung hoạt chất fucoidan vào thức ăn thì chỉ tiêu THC tăng lên và khác biệt so với trước cảm nhiễm. Việc bổ sung rong vào mô hình nuôi được xác định có vai trò duy trì chất lượng nước ao tốt (Elle *et al.*, 2017). Do vậy, dù không trực tiếp bổ sung vào thức ăn cho tôm như các thí nghiệm trên, chất lượng nước nuôi tốt cũng cho thấy sự gia tăng một số chỉ tiêu miễn dịch.

Bảng 1: Thông số các chỉ tiêu miễn dịch của tôm sú ở các nghiệm thức sau 60 ngày thí nghiệm ($\times 10^4$ tb/mm³)

Nghiệm thức	Thông số miễn dịch			
	THC (10^4 tb/mm ³)	LGC (10^4 tb/mm ³)	HC (10^4 tb/mm ³)	PO (490 nm)
NTI (100%TĂ –RC)	0,90±0,06 ^d	0,78±0,06 ^d	0,12±0,02 ^c	0,119±0,009 ^c
NTII (100%TĂ+RC)	1,23±0,06^a	1,06±0,05^a	0,18±0,01^a	0,166±0,011^a
NTIII (75%TĂ+RC)	1,10±0,06 ^b	0,94±0,06 ^b	0,16±0,02 ^{ab}	0,154±0,010^a
NTIV (50%TĂ+RC)	1,05±0,08 ^{bc}	0,89±0,07 ^{bc}	0,15±0,01 ^b	0,137±0,009 ^b
NTV (25%TĂ+RC)	1,00±0,06 ^c	0,85±0,06 ^{cd}	0,15±0,01 ^b	0,133±0,013 ^b

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột mang mẫu tự (^{a,b,c,d}) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$).

Định loại bạch cầu: Chỉ tiêu định loại bạch cầu có hạt (LGC) và bạch cầu không hạt (HC) được trình bày ở Bảng 1; kết quả cho thấy (i) số lượng LGC tăng ở các nghiệm thức bổ sung RC (NTII, NTIII, NTIV và NTV) và đều cao hơn so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung RC (NTI), trong đó số lượng LGC cao nhất ở NTII ($1,06 \times 10^4$ tb/mm³), đồng thời có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) đối với NTI ($0,78 \times 10^4$ tb/mm³), NTIII ($0,94 \times 10^4$ tb/mm³), NTIV ($0,89 \times 10^4$ tb/mm³) và NTV ($0,85 \times 10^4$ tb/mm³); (ii) Tương tự, số lượng HC gia tăng ở những nghiệm thức được bổ sung RC, trong đó NTII có số lượng HC cao nhất $0,18 \times 10^4$ tb/mm³ và khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$) so với NTI ($0,12 \times 10^4$ tb/mm³), NTIV ($0,15 \times 10^4$ tb/mm³) và NTV ($0,15 \times 10^4$ tb/mm³), tuy nhiên lại khác biệt không có ý nghĩa ($p < 0,05$) với NTIII ($0,16 \times 10^4$ tb/mm³) (Bảng 1). Kết quả trên cho thấy ở NTII bổ sung RC và cho ăn theo nhu cầu (100%) có sự gia tăng cao nhất về chỉ tiêu THC, HC so với các nghiệm thức khác. Như vậy, việc bổ sung RC có tác động tích cực lên hệ miễn dịch và sức đề kháng của tôm sú trong thí nghiệm thông qua khả năng gia tăng số lượng bạch cầu. Tương tự, Lin *et al.* (2011) ghi nhận chất chiết xuất từ rong câu (*Gracilaria tenuistipitata*) giúp tôm thẻ chân trắng gia tăng các chỉ số THC và LGC và khả năng đáp ứng miễn dịch đối với virus gây bệnh đốm trắng (WSSV).

Hoạt tính PO: sau 60 ngày nuôi kết hợp với RC thì hoạt tính PO được ghi nhận đạt giá trị cao nhất ở NTII là $0,166 \pm 0,011$ và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với NTI, NTIV và NTV nhưng lại không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) đối

với NTIII (75%TĂ+RC). Kết quả cho thấy những nghiệm thức bổ sung RC có tác dụng làm tăng hoạt tính PO. Kết quả thí nghiệm cũng tương tự với kết quả sử dụng chất chiết xuất thảo dược từ *Acalypha indica*, *Cynodon dactylon*, *Picrorrhiza kurroo*, *Withania somnifera*, *Zingiber officinalis* với các chế độ ăn khác nhau và cho ăn liên tục trong 60 ngày. Trong đó, chỉ số THC và hoạt tính PO tăng và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa nhóm nghiệm thức có bổ sung chiết xuất thảo dược so với nhóm đối chứng (Yoeswaran *et al.*, 2012).

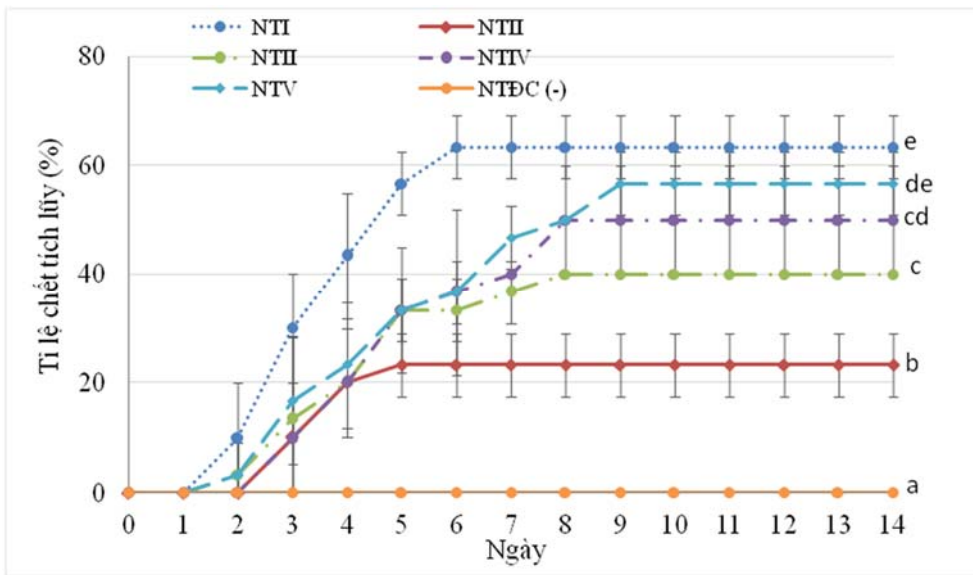
Kết quả thí nghiệm ghi nhận sau 60 ngày nuôi kết hợp RC và chế độ cho ăn thức ăn khác nhau thì các chỉ tiêu THC, HC và hoạt tính PO đều tăng ở các nghiệm thức có bổ sung RC so với nghiệm thức đối chứng, tăng cao nhất là ở NTII (có bổ sung rong câu và cho ăn theo nhu cầu).

3.2 Ảnh hưởng của mô hình nuôi kết hợp và chế độ cho ăn lên khả năng đề kháng của tôm sú với *V. parahaemolyticus*

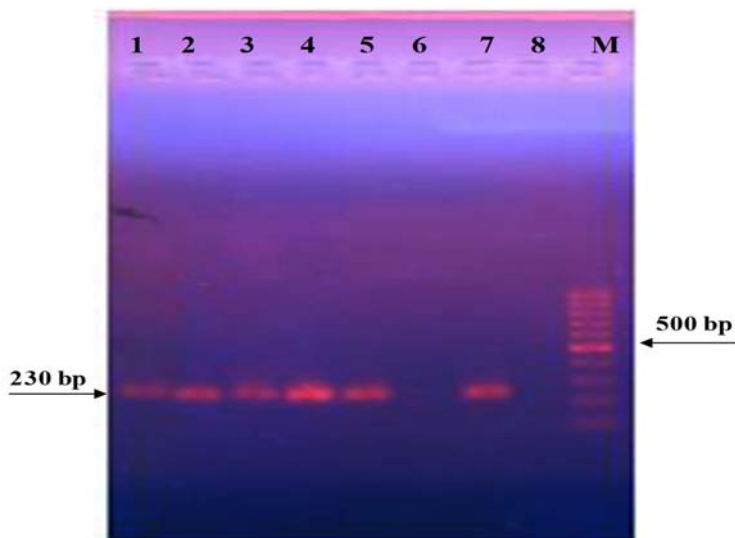
Sau 60 ngày nuôi thí nghiệm, tôm sú được cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp ngâm. Sau đó, tôm cảm nhiễm được theo dõi ghi nhận dấu hiệu bệnh lý và tỉ lệ chết trong 14 ngày. Kết quả cho thấy (i) Nhóm tôm không cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* (NT VI: nghiệm thức đối chứng âm- tôm được ngâm với nước muối sinh lý) không xuất hiện tôm chết, tỉ lệ sống đạt 100% đến khi kết thúc thí nghiệm. Tôm hoạt động bình thường, gan tụy sẫm màu, ruột đầy thức ăn; (ii) Nhóm tôm cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* (NTI; NTII; NTIII; NTIV và NTV) ghi nhận tôm

chết xuất hiện vào ngày thứ 2 và tỉ lệ chết tăng dần đến ngày thứ 9. Tôm chết tập trung ở NTI, NTIII và NTV còn ở NTII và NTIV thì tôm bắt đầu chết vào ngày thứ ba và kết thúc vào ngày thứ tám sau cảm nhiễm. Kết quả ghi nhận tỉ lệ chết tích lũy của tôm ở NTI (không bổ sung RC) là 63,3% cao hơn hẳn so với các nghiệm thức còn lại có bổ sung RC (NTII - tỉ lệ chết 23,3%; NTIII tỉ lệ chết 40%; NTIV tỉ lệ chết 50%; NTV tỉ lệ chết 56,7%) (Hình 1). Điều này chứng tỏ nuôi tôm kết hợp với RC có khả năng giúp tôm tăng cường sức đề kháng với *V. parahaemolyticus*. Như vậy, rong biển có tác dụng cải thiện hệ miễn dịch giúp tôm tăng tỉ lệ sống.

Huxley and Lipton (2009) sử dụng rong biển *Sargassum wightii* bổ sung vào thức ăn của tôm sú với hàm lượng 100mg/100g cho thấy tỉ lệ sống đạt đến 96,66%. Hoặc, tôm thẻ chân trắng nuôi trong điều kiện có bổ sung hỗn hợp ly trích polysaccharide từ rong nâu (*Sargassum hemiphyllum* var. *Chinense*), ở nồng độ 300–500mg/l cho hiệu quả rất tốt trong việc giúp tăng miễn dịch và kháng lại *V. alginolyticus*. Các hợp chất ly trích từ rong nâu cũng được đánh giá là có khả năng giúp tăng cường sức đề kháng, kích thích miễn dịch cho động vật thủy sản (Giang *et al.*, 2011).



Hình 1: Tỉ lệ chết tích lũy của tôm sú trong 14 ngày cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*

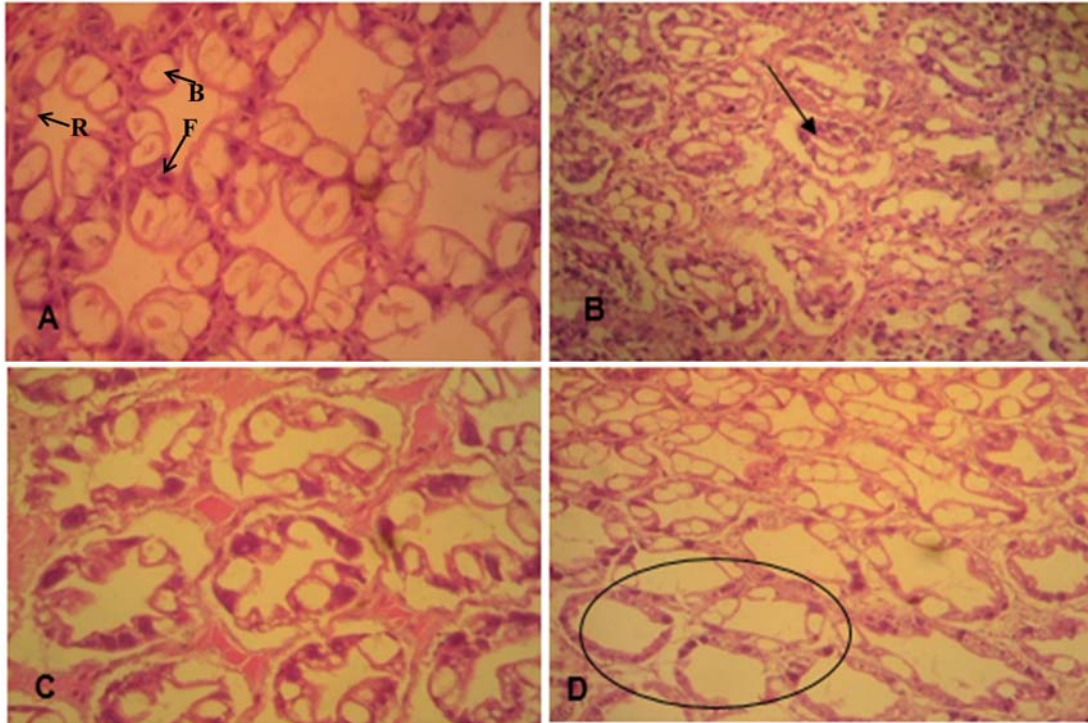


Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *V. parahaemolyticus*

M: thang DNA 100bp; Giếng 1-5: tương ứng với các nghiệm thức từ I đến V-cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*; Giếng 6: tương ứng nghiệm thức đối chứng âm không cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*; Giếng 7: đối chứng dương; Giếng 8: đối chứng âm.

Mẫu tôm cảm nhiễm được kiểm tra bằng phương pháp PCR, kết quả xác định mẫu tôm ở nghiệm thức đối chứng âm cho kết quả âm tính với *V.parahaemolyticus*, sản phẩm không hiện vạch (Giếng 6). Ngược lại, mẫu tôm ở những nghiệm thức cảm nhiễm cho kết quả dương tính với *V. parahaemolyticus* với sản phẩm khuếch đại ở 230 bp (Giếng 1 đến 5) (Hình 2). Kết quả kiểm tra mẫu tôm cảm nhiễm bằng phương pháp PCR cho thấy tôm thí nghiệm chết đều có nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Ngoài ra, kết quả mô học cho thấy cấu trúc ống gan tụy của tôm sú ở nghiệm thức đối chứng âm có biểu hiện bình thường với sự hiện diện của số lượng lớn tế bào B và tế bào dự trữ (tế bào R) (Hình 3A). Tiêu bản mô học ở các nghiệm thức có bổ sung RC và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* ghi nhận sự biến đổi cấu trúc ống gan tụy, cụ thể là các ống gan tụy mất cấu trúc hình sao, ống gan tụy teo, giảm hoặc mất tế bào B, R và sự tập trung của tế bào máu xung quanh ống gan tụy (Hình 3 B, C, D).



Hình 3: Đặc điểm mô học gan tụy tôm nhuộm H & E (100X)

(A) Mẫu gan tụy tôm khỏe với số lượng lớn tế bào B, R, F và cấu trúc hình sao; (B) ống gan tụy bị biến đổi cấu trúc (mũi tên) và sự tập trung của tế bào máu; (C) ống gan tụy tôm biến đổi cấu trúc; (D) ống gan tụy tôm mất cấu trúc hình sao, teo và không có sự hiện diện của tế bào B, R (vòng tròn)

Như vậy, kết quả thí nghiệm cho thấy khi nuôi kết hợp tôm với RC và có chế độ cho ăn thích hợp đã tác động tích cực gia tăng sức đề kháng của tôm chống lại vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính *V. parahaemolyticus*, và giúp hạn chế tỉ lệ chết của tôm thí nghiệm.

4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Tôm sú nuôi kết hợp với rong câu (*Gracilaria* sp.) ở mật độ 1kg/m³ ghi nhận sự gia tăng các chỉ tiêu tổng tế bào máu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt, hoạt tính PO, cao nhất ở nghiệm thức bổ sung rong câu và cho ăn thỏa mãn nhu cầu (100%).

Tôm sú nuôi kết hợp với rong câu ở mật độ 1kg/m³ khi được cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*

ghi nhận có tỉ lệ chết thấp (23,3%) ở nghiệm thức bổ sung rong câu và cho ăn thỏa mãn nhu cầu (100%) so với nghiệm thức đối chứng (63,3%).

Nghiên cứu đề xuất thực hiện thí nghiệm xác định tác động tích cực của mô hình nuôi kết hợp tôm với các loài rong biển khác phổ biến ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chen, Y.Y., Sim, S.S., Chiew, S.L., Yeh, S.T., Liou, C.H., and Chen, J.C., 2012. Dietary administration of a *Gracilaria tenuistipitata* extract produces protective immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* in response to ammonia stress. *Aquaculture*. 370-371: 26-31.

- Cruz-Suarez, L.E., Tapia Salazar, M., Nieto López, M.G., and Ricque Marie, D., 2008. A review of the effects of macroalgae in shrimp feeds and in co-culture. IX Simposio Internacional de Nutricion Acuicola. Noviembre. Mexico. pp. 304-333.
- Cruz-Suarez, L. E., Leons, A., Pensa-Rodriguez, A., Rodriguez-Penax, G., Moll, B., and Ricque-Marie, D., 2010. Shrimp/Ulva co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture*. 301(1-4): 64-68.
- Chang, J., Zhang, W., Mai, K., Ma, H., Liufu, Z., Wang, X., Ai, Q., and Xu, W., 2011. Effects of β -glucan and glycyrrhizin on non-specific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) challenged with *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture Research*. 42(8):1101-1109.
- Cornick, J.W., and Stewart, J.E., 1978. Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: classification, differential counts, and associated agglutinin activity. *Journal of Invertebrate Pathology*. 31(2): 194-203.
- Dung, T.T., Haesebrouck, F., Tuan, N.A., Sorgeloos, P., Baele, M., and Decostere, A., 2008. Antimicrobial susceptibility pattern of *Edwardsiella ictaluri* isolates from natural outbreaks of Bacterial Necrosis of *Pangasianodon hypophthalmus* in Vietnam. *Microbial Drug Resistance*. 14(4): 311-316.
- Elle, B.J., Corre, V.Jr., Felarca, K.G., and Pedroso, F., 2017. Potential of *Gracilariopsis bailinae* and *Oreochromis mossambicus* in improving water quality in intensive *Litopenaeus vannamei* tank culture. *AAFL Bioflux*. 10(5):1309-1318.
- McHugh, D., 2003. A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries, Technical Paper N° 441. FAO, Rome, Italy.
- Giang, H.T., Yeh, S.T., Lin, Y.C., Shyu, J.F., Chen, L.L., Chen, J.C., 2011. White shrimp *Litopenaeus vannamei* immersed in seawater containing *Sargassum hemiphyllum* var. *chinense* powder and its extract showed increased immunity and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 31(2):286-293.
- Hernandez-Lopez, J., Gollas-Galván, T., and Vargas-Alboreo, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown Shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Physiology*. 113(1): 61- 66.
- Huỳnh Quang Năng, 2005. Báo cáo tổng kết đề tài: Xây dựng mô hình trồng rong sụn (*Kappaphycus alvarezii*) luân canh trong ao địa nuôi tôm ven biển. Viện khoa học và công nghệ Việt Nam, phân viện khoa học vật liệu Nha Trang.
- Huxley, V.A.J., and Lipton, A.P., 2009. Immunomodulatory effect of *Sargassum wightii* on *Penaeus monodon* (Fab.). *The Asian Journal of Animal Science*. 4(2): 192-196.
- Le Moullac, G., M., Le Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P., and Aquacop, 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: protection against Vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*. 7(4): 227- 234.
- Lê Hồng Phước, Lê Hữu Tài và Nguyễn Văn Hào, 2011. Diễn biến của hội chứng hoại tử gan tụy trong ao nuôi tôm thâm canh ở huyện Trần Đề, tỉnh Sóc Trăng. Ngày truy cập 20 tháng 10 năm 2015. Địa chỉ <http://fof.hcmuaf.edu.vn/data/file/31.pdf>
- Lê Như Hậu và Nguyễn Hữu Đại, 2007. Hiện trạng tài nguyên, sử dụng agarophytes tại Việt Nam và tiềm năng phát triển văn hóa. *Tuyên tập báo cáo hội nghị quốc gia*, trang 109-120.
- Lightner, D.V., 1996. *A Handbook of Shrimp Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Cultured Penaeid Shrimp* (Special Publication of the World Aquaculture Society). Baton Rouge, LA: World Aquaculture Society.
- Lin, Y.C., Yeh, S.T., Li, C.C., Chen, L.L., Cheng, A.C., and Chen, J.C., 2011. An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology*. 31(6): 1239-1246.
- Marinho-Soriano, E., Camara, M.R., Cabral, T.D.M., and Carneiro, D.A., 2007. Preliminary evaluation of the seaweed *Gracilaria cervicornis* (Rhodophyta) as a partial substitute for the industrial feeds used in shrimp (*Litopenaeus vannamei*) farming. *Aquaculture Research*. 38(2): 182-187.
- Nguyễn Thị Ngọc Anh, Đinh Thị Kim Nhung và Trần Ngọc Hải, 2014. Hiệu quả sử dụng thức ăn của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) trong nuôi kết hợp với rong bún (*Enteromorpha* sp.) và rong mền (Cladophoraceae). *Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 31: 98-105.
- Ihsan, Y.N., 2012. Nutrient fluxes in multitrophic aquaculture systems. Master of science. Kiel University, Germany.
- Izzati, M., 2011. The role of seaweeds *Sargassum polycistum* and *Gracilaria verrucosa* on growth performance and biomass production of tiger shrimp (*Penaeus monodon* Fabr). *Journal of Coastal Development*. 14(3): 235-241.
- Sivagnanavelmurugan, M., Thaddaeus, B.J., Palavesam, A., and Immanuel, G., 2014. Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune

- resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. Fish & Shellfish Immunology. 39(2): 439-449.
- Rejeki, S., Ariyati, R.W., and Widowati, L.L., 2016. Application of integrated multi tropic aquaculture concept in an abraded brackish water pond. Jurnal teknologi. 78(4-2): 227-232.
- Sirirustananun, N., Chen, J.C., Lin, Y.C., et al., 2011. Dietary administration of a *Gracilariatenuistipitata* extract enhances the immune response and resistance against *Vibrio alginolyticus* and white spot syndrome virus in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Fish & Shellfish Immunology. 31(6): 848-855.
- Sritunyalucksana, K., Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., et al., 2014. A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria. The Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific. Accessed on 20 August 2015. Available from http://www.enaca.org/modules/news/article.php?article_id=2030.
- Tawil, N.E., 2010. Effects of green seaweeds (*Ulva* sp.) as feed supplements in red Tilapia (*Oreochromis* sp.) diet on growth performance, feed utilization and body composition. Journal of the Arabian Aquaculture Society. 5(2): 179-194.
- Tran, L.H., Nunan, L., Redman, R.M., et al., 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. Diseases of Aquatic organisms. 105(1): 45-55.