



ISO 9001 : 2008

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH
HỘI ĐỒNG KHOA HỌC

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP TRƯỜNG

THỬ NGHIỆM BỘT RONG BÚN (*Enteromorpha Intestinalis*) ĐỂ PHÒNG BỆNH VI KHUẨN (*Vibrio Harveyi*) TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus Vannamei*) NUÔI CÔNG NGHIỆP TẠI TRÀ VINH

Chủ nhiệm đề tài: ThS. CHÂU HỒNG THÚY
Chức danh: Giảng viên
Đơn vị: Khoa Nông nghiệp – Thủy sản

Trà Vinh, ngày tháng năm 2017



ISO 9001 : 2008

TRƯỜNG ĐẠI HỌC TRÀ VINH
HỘI ĐỒNG KHOA HỌC

BÁO CÁO TỔNG KẾT
ĐỀ TÀI NGHIÊN CỨU KHOA HỌC CẤP TRƯỜNG

THỬ NGHIỆM BỘT RONG BÚN (*Enteromorpha Intestinalis*) ĐỂ PHÒNG BỆNH VI KHUẨN (*Vibrio Harveyi*) TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus Vannamei*) NUÔI CÔNG NGHIỆP TẠI TRÀ VINH

Xác nhận của cơ quan chủ quản

(Ký, đóng dấu, ghi rõ họ tên)

Chủ nhiệm đề tài

(Ký, ghi rõ họ tên)

Châu Hồng Thúy

Trà Vinh, ngày tháng năm 2017

TÓM TẮT

Đề tài “**thử nghiệm bột rong bún (*Enteromorpha intestinalis*) để phòng bệnh vi khuẩn (*Vibrio harveyi*) trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) nuôi công nghiệp tại Trà Vinh**” được thực hiện tại Trường Đại học Trà Vinh nhằm mục tiêu đánh giá khả năng phòng bệnh vi khuẩn *vibrio harveyi* của bột rong bún (*Enteromorpha intestinalis*) trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) nuôi công nghiệp, nhằm góp phần hạn chế sử dụng kháng sinh trong nuôi tôm và đảm bảo an toàn thực phẩm. Đề tài thực hiện với 2 nội dung chính là xác định nồng độ ức chế tối thiểu (minimum inhibited concentration - MIC) của bột rong bún lên vi khuẩn *Vibrio harveyi* và đánh giá khả năng kháng khuẩn của bột rong bún trên vi khuẩn *vibrio harveyi*.

Kết quả xác định khả năng kháng khuẩn của rong bún lên vi khuẩn *vibrio harveyi* dao động từ 8-12mm; kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu cho thấy ở nồng độ 200mg/ml rong bún có khả năng ức chế hoàn toàn đối với vi khuẩn *vibrio harveyi*. Kết quả thí nghiệm gây cảm nhiễm sau cho thấy ở nghiệm thực đối chứng tôm chết với tỉ lệ rất cao và mật số vi khuẩn tồn tại trong tôm rất lớn (1101 khuẩn lạc), mật số vi khuẩn tồn tại trên tôm càng giảm khi cho tôm ăn với liều lượng rong bún càng tăng, cụ thể ở liều lượng 1MIC mật số vi khuẩn tồn tại 376 khuẩn lạc, ở nghiệm thức 2MIC mật số vi khuẩn tồn tại 83 khuẩn lạc. Như vậy rong bún có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio harveyi* khi cho tôm ăn với liều 400mg/ml.

Từ khóa: *Vibrio harveyi*, rong bún, MIC

MỤC LỤC

TÓM TẮT	i
MỤC LỤC.....	ii
DANH SÁCH BẢNGiii
DANH SÁCH HÌNH.....	iv
DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT.....	v
LỜI CẢM ƠN	vi
PHẦN I. MỞ ĐẦU	1
Tính cấp thiết.....	1
Mục tiêu nghiên cứu.....	2
Nội dung nghiên cứu	2
PHẦN II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	3
2.1. Tổng quan về rong biển.....	3
2.2. Tình hình dịch bệnh trên tôm thẻ chân trắng	10
2.3. Tình hình sử dụng thuốc và hóa chất trong NTTS	12
2.4. Tình hình nghiên cứu và sử dụng các loại thảo dược trong phòng trị bệnh ở động vật thủy sản tại Việt Nam.....	13
PHẦN III. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	17
PHẦN IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	25
PHẦN V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT.....	29
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	30
PHỤ LỤC.....	33

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 4.1 Ghi nhận số liệu tôm chết sau khi gây cảm nhiễm	31
Bảng 4.2 Kết quả trải mẫu.....	31

DANH SÁCH HÌNH

Trang

Hình 2.1 Rong bún	4
Hình 3.1 Sơ đồ nghiên cứu tổng quát.....	20
Hình 3.2 Thu rong bún	21
Hình 3.3 Phơi rong	21
Hình 3.4 Chuẩn bị dụng cụ thu mẫu tôm	21
Hình 3.5 Thu mẫu tôm bệnh	21
Hình 3.6 Tôm bệnh	22
Hình 3.7 Cây mẫu tôm trên môi trường.....	22
Hình 3.8 Đĩa khuẩn lạc thuần.....	22
Hình 3.9 Cân rong đã phơi khô	23
Hình 3.10 Nghiền rong.....	23
Hình 3.11 Xác định LD50	26
Hình 3.12 Bố trí thí nghiệm	27
Hình 4.1, 4.2 Tôm bệnh phân trắng	28
Hình 4.3 Vi khuẩn <i>Vibrio harveyi</i>	28
Hình 4.4 Vk <i>Vibrio harveyi</i> sau khi nhuộm Gram.....	28
Hình 4.5 Kết quả xác định khả năng kháng khuẩn bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch	29
Hình 4.9 Kết quả thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu của rong bún	30
Hình 4.7 Kết quả trải các ống MIC lên đĩa môi trường	30
Hình 4.8 Tôm trước khi khí nghiệm	31
Hình 4.9 Tôm ở NT đối chứng có dấu hiệu bệnh	31
Hình 4.10, 4.11 Kết quả phân lập vi khuẩn ở NT ĐC và NT rong bún sau khi gây cảm nhiễm	31

LỜI CẢM ƠN

Xin tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến Ban Giám Hiệu, Hội đồng khoa học Khoa Nông Nghiệp Thủy Sản, các anh chị em bộ môn Thủy Sản đã tạo điều kiện cho tôi thực hiện đề tài.

Cám ơn các em Hồ Thị Ngọc Hân lớp DA13TS, Lê Nguyễn Duy Nhứt lớp DA13TS, Trần Thị Cẩm Hồng lớp DA14TS, Nguyễn Quỳnh Giao lớp DA14TS đã giúp đỡ tôi rất nhiều trong quá trình thực hiện đề tài

Xin chân thành cảm ơn!

PHẦN I: MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của đề tài

Việc thâm canh hóa các đối tượng thủy sản đã góp phần nâng cao hiệu quả trong nuôi trồng thủy sản, ngoài các đối tượng xuất khẩu như cá tra, rô phi, điêu hồng... Tôm thẻ là một trong những đối tượng có giá trị xuất khẩu cao. Tuy nhiên, việc mở rộng diện tích nuôi cũng như việc đa dạng các đối tượng nuôi và thâm canh hóa đã phát sinh nhiều vấn đề đáng quan tâm như môi trường, con giống, thức ăn và dịch bệnh. Trong quá trình nuôi tôm thường xuất hiện các bệnh virus, vi khuẩn... Trong đó bệnh truyền nhiễm do vi khuẩn *vibrio* đã gây thiệt hại rất lớn trong nghề nuôi tôm công nghiệp (Oanh và *ctv* 2014). Mặt khác, biến đổi khí hậu làm thay đổi môi trường do đó vấn đề dịch bệnh cũng diễn biến ngày càng phức tạp hơn. Hiện nay đa số người nuôi vẫn còn thói quen điều trị theo cảm tính, trị bao vây, đã sử dụng nhiều loại thuốc và hóa chất kết hợp một cách tùy tiện, không hợp lý và không mang lại hiệu quả. Việc điều trị bệnh như vậy sẽ làm gia tăng sự kháng thuốc của vi khuẩn gây bệnh, dư lượng thuốc sẽ tồn lưu trong thịt tôm và môi trường, gây ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe cộng đồng.

Thảo dược được biết đến như một loại thuốc phòng và trị bệnh trên người hàng ngàn năm qua. Ngày nay, các nhà nghiên cứu cũng đã quan tâm đến thảo dược trong việc phòng và trị bệnh cho gia súc và động vật thủy sản. Nhiều nghiên cứu cho thấy thảo dược dùng trong thủy sản có tác dụng diệt vi khuẩn gây bệnh, tăng cường sức đề kháng và chống oxy hóa. Dùng thảo dược có nguồn gốc dược liệu tự nhiên, nhằm giảm thiểu việc sử dụng hóa chất và kháng sinh trong thủy sản, đảm bảo an toàn thực phẩm và thân thiện với môi trường xung quanh. Gần đây có sự quan tâm lớn về các chất kích thích miễn dịch có trong thảo dược sử dụng trong nuôi trồng thủy sản.

Rong biển nói chung và rong bún (*Enteromorpha* spp) nói riêng thuộc ngành rong lục, xuất hiện tự nhiên ở vùng biển nhiệt đới và á nhiệt đới trên khắp thế giới và cũng được tìm thấy ở vùng cửa sông đầm nước lợ và có khả năng chịu sự biến động lớn của độ mặn (Budd and Pizzola, 2002). Nguyễn Thị Ngọc Anh, 2013 đã khẳng định, rong bún có sinh lượng lớn và có giá trị dinh dưỡng cao, vì vậy tiềm năng sử dụng rong bún trong nuôi trồng thủy sản ở ĐBSCL là thiết thực. Khi bổ sung rong biển vào thức ăn cho các đối tượng thủy sản giúp cải thiện sự tăng trưởng, hiệu quả sử dụng thức ăn, tăng hàm lượng triglyceride và protein trong cơ cá. Ngoài ra, cá ăn thức ăn chứa rong biển còn giúp tăng đề kháng bệnh và chống stress (Fleurence, 1999). Khi nghiên cứu ảnh hưởng khi cho ăn trực tiếp rong bún *Enteromorpha intestinalis* và *E. clathrata* lên sinh trưởng và khả năng kháng bệnh của cá *Etroplus suratensis* Neelakandan *et al* (2011) đã khẳng định cá được cho ăn hai loài rong bún có tăng trưởng về chiều dài và khối lượng cao hơn có ý nghĩa so với nhóm cá cho ăn thức ăn công nghiệp, đặc biệt cá cho ăn rong bún *Enteromorpha intestinalis* không có triệu chứng bệnh. Huỳnh Trường Giang và *ctv* (2011) khẳng định beta glucan trong rong bún có tác dụng tăng cường kích thích hệ miễn dịch trên các đối tượng thủy sản.

Qua lược khảo các công trình nghiên cứu khoa học về rong biển trên thế giới và trong nước, các tác giả trong nước chủ yếu nghiên cứu về nguồn lợi và tiềm năng của rong biển là chủ yếu. Gần đây một số tác giả đã nghiên cứu thành phần hóa học cũng như thành phần dinh dưỡng của rong biển, một số nghiên cứu cũng đã khẳng định giá trị dinh dưỡng trong rong biển rất cao và ứng dụng tốt trong nuôi trồng thủy sản. Một số nhà khoa học nước ngoài cũng đã nghiên cứu các chất chiết xuất từ rong biển trong phòng, trị bệnh trên tôm, kết quả bước đầu cũng đã khẳng định các beta glucan chiết xuất từ rong biển có khả năng phòng trị bệnh trên tôm nuôi công nghiệp. Tuy nhiên các nghiên cứu hầu như chỉ mới bắt đầu. Vì vậy, cần có những nghiên cứu sâu hơn về những ứng dụng của rong biển trong phòng trị bệnh trên các đối tượng thủy sản, đặc biệt trong điều kiện biến đổi khí hậu như hiện nay thì vấn đề dịch bệnh trên thủy sản rất phức tạp.

Từ những thành tựu khoa học trên, đề tài này sẽ tiến hành thử nghiệm bột rong bún để phòng bệnh *vibrio harveyi* trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) nuôi công nghiệp tại Trà Vinh.

Mục tiêu của đề tài:

Đánh giá khả năng phòng bệnh vi khuẩn *vibrio harveyi* của bột rong bún (*Enteromorpha intestinalis*) trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) nuôi công nghiệp, nhằm góp phần hạn chế sử dụng kháng sinh trong nuôi tôm và đảm bảo an toàn thực phẩm.

Nội dung triển khai nghiên cứu:

Nội dung 1: Thu mẫu rong và thử nghiệm khả năng kháng vi khuẩn *vibrio harveyi* của bột rong bún (tính nhạy).

Nội dung 2: Đánh giá khả năng kháng khuẩn của bột rong bún trên vi khuẩn *vibrio harveyi*

PHẦN II: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Tổng quan về rong biển

Rong biển là một hợp phần quan trọng của nguồn lợi sinh vật biển, chúng là bãi đẻ và nơi cư trú cho các loài động vật biển, có khả năng hấp thu mạnh các chất dinh dưỡng trong môi trường, chế biến và sử dụng trong nhiều lĩnh vực như thực phẩm, y dược, mỹ phẩm, nông nghiệp, chiết xuất nhiên liệu sinh học và có thể cân bằng sinh thái bền vững. Ngoài ra, rong biển chứa nhiều chất dinh dưỡng, các nguyên tố vi lượng, có thể được sử dụng làm thức ăn cho người và thủy sản. Đặc biệt rong biển có vai trò như máy lọc sinh học cũng như có vai trò trong việc bảo vệ nguồn gống sinh vật biển và đa dạng sinh học (FAO, 2003; Dhargalka & Pereira, 2005).

Nhiều nghiên cứu đã tìm thấy rong biển có giá trị dinh dưỡng cao và thay đổi theo loài, theo các giai đoạn phát triển, giàu chất khoáng (iod và canxi), vitamin B12, C) và các sắc tố fucoxanthin, fucosterol, phlorotannin. Đặc biệt đạm trong rong biển có tính tiêu hóa cao (98%) (Wahbeh, 1997; Fleurence, 1999; Aguilera-Morales, et al., 2005), Theo thông tin của tạp chí nghề cá Châu Âu (2/2007), nuôi tôm sú quảng canh ở Thái Lan khi có sự hiện diện của rong bún, tôm con ăn loài rong này thì tăng trưởng nhanh hơn và có màu sắc đậm hơn, thịt tôm rắn chắc và có mùi vị ngon hơn, đặc biệt chất lượng nước ao nuôi tốt hơn so với ao không có rong bún.

Đối với các hợp chất β -glucan ly trích từ rong biển thì Chotigeat *et al.* (2004) cũng có nghiên cứu trên loài tảo nâu *Sargassum polycystum*. Hợp chất fucoidan thô từ *S. polycystum* được ly trích bằng dung dịch HCl 0,1 N. Thí nghiệm được thực hiện trên tôm sú (*P. monodon*) ở 2 kích cỡ khác nhau (5 – 8 g và 12 – 15g). Kết quả cho thấy rằng ở cỡ tôm 5 – 8 g, tôm được cho ăn với liều lượng 400mg/ kg tôm/ ngày có tác dụng làm tăng tỉ lệ sống 46% sau 10 ngày cảm nhiễm với vi rút đốm trắng. Trong khi đó, đối với tôm có trọng lượng từ 12 – 15 g, chỉ với liều lượng 200 mg/ kg tôm/ ngày có tác dụng làm tăng tỉ lệ sống lên đến 93% sau 11 ngày gây cảm nhiễm và chỉ số thực bào đạt được $2,36 \pm 1,28$ so với đối chứng $0,83 \pm 0,6$. Cũng từ nghiên cứu này tác giả cũng đã chỉ ra rằng hợp chất fucoidan thô ly trích từ rong nâu *S. polycystum* có khả năng kháng khuẩn, với nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) đối với các loài vi khuẩn *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* và *Vibrio harveyi* lần lượt là 6,0, 12,0 và 12,0 mg/mL.

Hàng năm đại dương cung cấp cho trái đất khoảng 200 tỷ tấn rong biển. Nhiều nhà khoa học cho rằng trên 90% cacbon trên trái đất được tổng hợp nhờ quang hợp, trong đó 20% có nguồn gốc từ rong biển. Việc tiêu thụ sản phẩm từ rong biển (tảo đa bào ở biển) đã trải qua thời kì lịch sử rất lâu dài. Các dấu vết khảo cổ học cho thấy, người Nhật đã dùng rong biển từ hơn 10.000 năm trước.

Trong nền văn hoá Trung Quốc cổ đại, rong biển được coi là đặc sản dùng trong các món ăn của triều đình và chỉ hoàng tộc hay khách của hoàng thân, quốc thích mới được thưởng thức. Dù rong biển được coi là món ăn đặc trưng của châu Á, nhưng trên thực tế các quốc gia có bờ biển trên thế giới như Scotland, Ireland, Newzealand, quần đảo nam Thái Bình Dương và các nước Nam Mỹ ven biển cũng đã sử dụng rong biển từ rất lâu.

Rong biển cũng được sử dụng trong nhiều lĩnh vực khác. Chúng là nguồn nguyên liệu tự nhiên cho công nghiệp thực phẩm (Cải biển *Ulva lactuca*, bột rong biển, chất tạo gel E400, E401 Alginate–Agar E406, E407, Carrageenan...), mỹ phẩm (chất tạo kết cấu và hoạt hóa), công nghiệp (Phycocolloids, hydrocolloids tạo độ sánh, gel hoặc chất ổn định), thức ăn gia súc, nông nghiệp ...

Qua các tài liệu tham khảo trong lịch sử và trong thời gian sử dụng lâu dài, không có nguy cơ gây hại sức khỏe nào được đề cập đến rong biển. Vì vậy, rong biển được xếp vào loại thực phẩm chức năng ngày càng được sử dụng rộng rãi trên thế giới.

Hiện nay, Nhật Bản, Trung Quốc và Hàn Quốc là những nước tiêu thụ rong biển thực phẩm lớn nhất và nhu cầu của họ là cơ sở của một nghề nuôi trồng thủy sản với sản lượng hàng năm trên toàn thế giới khoảng 6 triệu tấn rong tươi, trị giá lên đến 5 tỉ USD. Các nước và lãnh thổ cung cấp rong biển thực phẩm chính là Trung Quốc, Nhật Bản, Hàn Quốc và Đài Loan. Các nước cung cấp chính rong biển cho công nghiệp là Đan Mạch, Pháp, Na Uy, Tây Ban Nha, Mỹ và Nhật.

Rong biển có chứa đa dạng các thành phần hoá học, chúng đều là các thành phần rất có giá trị về mặt dinh dưỡng cũng như dược liệu bao gồm: các axit amin, các axit béo nhiều nối đôi, các vitamin và khoáng chất, polyphenol, các hợp chất chứa iốt, laminaran, alginat và fucoidan. Trong số các hợp chất polysacarit của rong biển thì fucoidan là hợp chất được đặc biệt quan tâm nghiên cứu do chúng sở hữu rất nhiều hoạt tính sinh học thú vị (kháng u, kháng đông tụ máu, kháng virus, kháng viêm, chống oxy hóa,...) với tiềm năng ứng dụng rất lớn để làm dược liệu (Trích dẫn: Phạm Đức Thịnh, 2015).

2.1 Sơ lược về Rong bún (*Enteromorpha intestinalis*)

Ngành: *Chlorophyta*

Lớp: *Ulvophyceae*

Bộ: *Ulvales*

Họ: *Ulvaceae*

Giống: *Ulva*

Loài: *Ulva intestinalis* (Linnaeus, 1820)



Hình 2.1: Rong bún *Ulva intestinalis*

Ulva intestinalis, trước đây gọi là *Enteromorpha intestinalis*, là một loại tảo xanh trong ngành *Chlorophyta*, thuộc giống *Ulva* (rau diếp biển), còn được biết với tên gọi phổ biến cỏ tảo bẹ.

Đặc điểm hình thái học của *Enteromorpha*

Các loài rong bún thuộc giống *Enteromorpha* rất khó để phân biệt với nhau (Budd và Pizzola, 2002). Tàn rong dạng hình sợi dài, phân nhánh, dẹp hoặc rộng các nhánh lá của *Enteromorpha* có dạng ống, màu xanh lục và đôi khi bị tẩy trắng do sự thay đổi của điều kiện môi trường, để xác định một loài chính xác của *Enteromorpha* cần kiểm tra trên kính hiển vi về chi tiết tế bào của nó. Các tế bào trong *Enteromorpha* có thể thay đổi trong kích thước và hình dạng từ loài này sang loài khác. Mỗi tế bào có chứa một lục lạp duy nhất, thay đổi kích thước tùy thuộc vào kích thước của tế bào (Trích dẫn: Bùi Thị Ny, 2012).

Vòng đời của rong bún *Enteromorpha*

Giống nhiều loài tảo khác, *Enteromorpha* có hai hình thức sinh sản: vô tính và hữu tính. Tế bào tử có hai bộ nhiễm sắc thể, ký hiệu là $2n$. Trong khi đó thể giao tử chỉ có một bộ nhiễm sắc thể $1n$. Thông qua nguyên phân, giao tử (tế bào sinh sản hữu tính) được sinh ra bởi thể giao tử và phát triển thành một thể bào tử và giảm phân tạo ra hợp tử (tế bào sinh sản vô tính), và mỗi hợp tử phát triển thành 1 thể giao tử, thể giao tử này sau đó tạo ra nhiều giao tử hơn, và chu kỳ vẫn tiếp tục (Kirby, 2001). Các giao tử đực và cái có thể cùng hoặc khác kích thước, cả hai giao tử và hợp tử được sinh ra từ những tàn rong *Enteromorpha*, khi giao tử đực có màu cam vàng và giao tử cái có màu xanh thì chúng bắt đầu kết hợp lại với nhau để tạo thành một cây rong non. Các giao tử không thể tồn tại trong thời gian dài sau khi được phát tán nếu chúng không tìm thấy một giao tử khác hoặc một nơi để phát triển (Trích dẫn : Bùi Thị Ny, 2012).

Điều kiện sinh trưởng của rong Bún

Rong bún *Enteromorpha* phân bố chủ yếu ở các ao hồ nước tĩnh, nước trong, độ mặn thấp. Trong các ao quảng canh, tự nhiên và ao nước thải, những ao hồ gần khu dân cư hoặc trên các trảng có vật thể để bám dính. Mùa vụ xuất hiện rong bún, thường vào mùa mưa khi mà độ mặn giảm thấp khoảng 2 - 25‰, vào mùa nắng nóng rong bún ít xuất hiện và có hiện tượng tàn lụi .

Phân bố

Enteromorpha là loài phân bố trên toàn thế giới, trong nhiều môi trường khác nhau, nó có thể chịu được các độ mặn khác nhau từ nước ngọt đến nước biển và cũng tìm thấy ở suối nước mặn.

Chúng có thể phát triển trên bờ biển đại dương, trong vùng nước lợ và trong nội địa nước ngọt, *Enteromorpha* cũng có thể phát triển trên nhiều loại nền đáy: cát, bùn hoặc đất đá, thậm chí cả gỗ, bê tông hoặc kim loại hoặc phát triển tự do mà không cần giá thể, *Enteromorpha* cũng phát triển ở bãi triều ven biển, nó cũng có thể phát triển với các loại rong và tảo khác trong nhiều môi trường sống khác nhau .

Theo kết quả khảo sát thành phần loài và phân bố của rong biển tại Cù Lao Chàm-Quảng Nam của Đinh Thị Phương Anh và Hoàng Thị Ngọc Hiếu (2010) đã tìm thấy các loài rong bún chỉ mọc ở một số khu vực yên sóng, nước tĩnh và một số loài rong bún chỉ

phân bố ở khu vực có dân cư sinh sống gồm các loài *Ulva kyllini*, *Ulva intestinalis*, *Ulva forme*, *Ulva sp* (Trích dẫn : Bùi Thị Ny, 2012).

Một số nghiên cứu theo hướng ứng dụng cho thấy, loài rong *Ulva intestinalis* có tiềm năng ứng dụng lớn, ngoài khai thác sinh khối cho hoạt động chuyển hóa ethanol, chiết xuất protein, làm phân bón vi sinh,... thì loài rong này có vai trò quan trọng trong các thủy vực do khả năng chuyển hóa các dinh dưỡng hữu cơ dư thừa thành sinh khối với tốc độ khá nhanh.

Môi trường nơi có sự hiện diện của *Ulva intestinalis* có độ mặn khá rộng từ 3 – 28 ppt. Ở các xã Bình Khánh, An Thới Đông, Tam Thôn Hiệp và Lý Nhơn. Nền độ mặn vào mùa mưa thấp hơn ở các xã ven biển Long Hòa và Thạnh An. Vào mùa khô độ mặn ở các xã Bình Khánh, An Thới Đông, Tam Thôn Hiệp và Lý Nhơn được nâng cao. Nền độ mặn toàn vùng của huyện Cần Giờ nơi có sự hiện diện của *Ulva intestinalis* dao động trong khoảng 3ppt đến 28ppt theo các đơn vị quan trắc xa hoặc gần bờ biển.

pH ghi nhận được dao động từ 6,5 - 8,1, biến động của pH giữa 2 mùa ở các địa phương khác nhau không thật sự rõ rệt.

Độ đục TSS ghi nhận được biến động theo các loại thủy vực và theo vùng phân bố. Giá trị TSS được ghi nhận cao nhất ở vùng Tam Thôn Hiệp là 221 mg/l và Lý Nhơn 193,3 mg/l.

Sự sinh trưởng và hình dạng của rong phụ thuộc vào các yếu tố môi trường và loại thủy vực. Trong đó môi trường ưa thích của rong *Ulva intestinalis* nằm trong độ mặn từ 10 – 20 ppt, pH dao động trong khoảng 7,4 – 8,1, độ sâu nền đáy thích hợp là 0,3 – 0,7 m.

Rong *Ulva intestinalis* có thể phát triển thành một quần thể lớn ở các điều kiện thuận lợi về môi trường sinh thái. Rong non thường sinh trưởng bám đáy, hoặc ở tầng nước thấp hơn so với rong già trong quần thể rong ghi nhận được, rong già thường hình thành bọt khí và nổi lên phía trên mặt nước.

Một số thủy vực có *Ulva intestinalis* phân bố thường có sự xuất hiện của một số nhóm rong khác như rong đuôi chồn (*Ceratophyllum sp.*), rong mềm (*Chaetomorpha sp.*), rong nhót (*Spirogyra sp.*) trong điều kiện môi trường có độ mặn 0 – 14 ppt; Rong đá (*Ceratophyllum demersum*) và rong mềm (*Chaetomorpha sp.*) ở độ mặn cao hơn, đến 28 ppt (Nguyễn Văn Tú, 2014).

Giá trị dinh dưỡng của rong bún

Theo kết quả phân tích của Aguilera-Morales et al. (2005), hàm lượng protein của rong bún dao động trong khoảng 11,6-25,5%, lipid 2,0-3,6%, tro (3236%), giàu chất khoáng (Iod và Canxi), vitamin (B12, C), và các sắc tố fucoxathin, fucosterol, phlorotanin. Tổng các axit amin thiết yếu chiếm 9,7816,58% trọng lượng khô và các axit béo thiết yếu alpha linolenic (omega 3 C18:3), đặc biệt đạm rong bún có tính tiêu hao cao (98%) (Fleurence, 1999; Aguilera-Morales et al. 2005).

Theo Sauze, (1981) được trích dẫn bởi Nguyễn Văn Luận (2011) thì *Enteromorpha sp.* Có chứa chất diệp lục b và khoáng chất, chẳng hạn như magie, canxi và sắt. Trong đó ngành rong lục *Chlorophyta* chứa 16-22,1% protein, tro 12,4-18,7% và 43,4-60,2%

carbohydrate. Qua kết quả của Nguyễn Văn Luận (2011), khảo sát về phân bố, biến động sinh lượng và thành phần sinh hóa của rong bún *Enteromorpha sp.* về thành phần sinh hóa cơ bản của *Eteromorpha sp.* từ các thủy vực khảo sát bao gồm: hàm lượng protein (7,28-26,64%), lipid (1,05-4,78%), tro (17,14-37,02%), xơ (2,949,24%) và carbonhydrate (36,50-59,76%). Cho thấy khả năng có thể sử dụng rong bún để làm nhiên liệu sinh học hoặc dùng làm thức ăn cho các loài thủy sản và con người.

Theo Dere et al. (2003) được trích bởi Hồ Thị Huỳnh Mai (2011), hàm lượng dinh dưỡng của rong biển xanh rất cao giá trị dinh dưỡng tùy thuộc vào từng loài, từng giai đoạn phát triển, mùa sinh sản và yếu tố môi trường. Kết quả phân tích sơ bộ thành phần sinh hóa cho thấy rong bún có giá trị dinh dưỡng cao, hàm lượng carbonhydrat đạt 20-25% khối lượng tươi ở rong bún già (Trích dẫn: Nguyễn Văn Tú, 2014).

Tình hình nghiên cứu và sử dụng các loại thảo dược trong phòng trị bệnh ở động vật thủy sản

Việc tăng năng suất, sản lượng Nuôi trồng thủy sản bằng cách ồ ạt phát triển nghề nuôi tôm khiến dịch bệnh ngày càng trở thành một vấn đề gây nhức nhối cho người nuôi. Để xử lý vấn đề này, các loại hoá chất, kháng sinh được xem như biện pháp đầu tiên được con người sử dụng để điều trị cho các loại thủy sản. Tuy nhiên, việc sử dụng các loại hoá chất, kháng sinh không đúng quy cách, liều lượng đang gây ảnh hưởng lớn tới sinh thái môi trường. Bên cạnh đó, việc tồn dư kháng sinh còn ảnh hưởng rất lớn tới sức khỏe của con người. Trong những năm gần đây, xu hướng sử dụng thảo dược trong điều trị cho bệnh thủy sản đang được sử dụng rộng rãi trong việc điều trị bệnh trên động vật thủy sản. Hơn nữa việc sử dụng thảo dược có biên độ an toàn lớn, ít ảnh hưởng tới môi trường sinh thái cũng như môi trường nuôi, đồng thời không ảnh hưởng tới sức khỏe của con người. Các chiết xuất từ thảo dược như hinokiticol, citral, allylisocyanate được sử dụng rộng rãi trong bảo quản, điều trị bệnh do nấm, vi khuẩn gây ra (Trích dẫn: Nguyễn Thế Vương, 2009).

Năm 1985, Khuê Lập Trung đã đưa ra 22 loài thảo dược, chủ yếu phòng trị các bệnh về vi khuẩn, ngoại ký sinh trùng, bệnh đường ruột cho tôm, cá và nhuyễn thể như: Xuyên tâm liên, địa niên thảo, lưu xở tử, quản trọng, ngũ bội tử, tiền thảo,...

Tại Thái Lan, Sataporn Direkbusarakom và ctv (1997) đã thử nghiệm thành công khả năng kháng khuẩn của các loài thảo dược như: *O. sanctum*, *C. alata*, *Tinospora cordifolia*, *Eclipa alba*, *Tinospora crispsa*, *Psidium guajava*, *Clinacanthus nutans*, *Andrographis paniculata*, *Momordica charantina*, *Phyllanthus reticulates*, *P. pulcher*, *P. acidus*, *P. debelis*, *P. amarus*, *P. debelis* và *P. urinaria* đối với vi khuẩn *Vibrio spp.* Tuy nhiên, chỉ có hai cây *P. guajava* và *M.charantina* có hiệu quả ức chế đối với *Vibrio spp.* Nồng độ ức chế tối thiểu của *P. guajava* là 0,625 mg/ml và *M. charantina* là 1,25 mg/ml (Trích dẫn: Nguyễn Thế Vương, 2009).

Hàm lượng polyphenol tổng số và hoạt tính chống oxy hóa của hai loài rong nâu *Turbinaria conoides* và *Turbinaria ornate* ở vùng biển Ấn Độ, được Chakraborty và ctv nghiên cứu 2013. Các phương pháp nghiên cứu đánh giá khả năng chống oxy hóa của dịch chiết rong được sử dụng trong nghiên cứu bao gồm khả năng bắt gốc tự do DPPH, 2, 2'-

azino – bis – 3 ethylbenzothiozoline – 6 – sulfonic acid diammonium salt (ABTS) và H_2O_2/HO , khóa ion Fe^{2+} và tổng năng lượng khử. Kết quả cho thấy khả năng chống oxy hóa của rong *Turbinaria donoides* cao hơn đáng kể so với rong *Turbinaria ornate*. Từ kết quả đạt được tác giả kết luận rằng dịch chiết của hai loại rong nâu này có thể sử dụng như thành phần của thực phẩm chức năng, giúp tăng cường sức khỏe cho con người (Trích dẫn: Nguyễn Thế Vương, 2009).

Các chất oxy hóa tiềm năng từ các loại rong biển *Kunakeshwar* dọc theo bờ biển phía tây Maharashtra, được Megha và ctv nghiên cứu vào năm 2013. Trong nghiên cứu này, hoạt tính chống oxy hóa của loài rong biển ăn được gồm có tảo biển (*Chaetomorpha media* và *Enteromorpha intestinalis*), rong nâu (*Padina tetrastromatica* và *dictyota dichotoma*) và rong đỏ (*Gracilaria corticata* và *Gelidiella acerosa*) đã được xác định sử dụng dung môi chiết là methanol và ethanol. Kết quả nghiên cứu này đã thấy *Enteromorpha intestinalis* với dung môi chiết là methanol và *Dictyota dichotoma* được chiết trong ethanol có hoạt tính chống oxy hóa tổng giảm mạnh hơn so với các loại rong khác (Trích dẫn: Nguyễn Thế Vương, 2009).

Năm 2013, Indu và Seenivansan đã nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa của một số loại rong ở vùng biển đông nam Ấn Độ gồm có: *Chaetomorpha linum*, *Grateloupia lithophila* và *Sargassum wightii*. Kết quả nghiên cứu cho thấy rong *Sargassum wightii* có hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn so với hai loại rong còn lại. Hoạt tính chống oxy hóa (xác định bởi khử gốc tự do DHHP) cao nhất khi *Sargassum wightii* được chiết trong dung môi ethanol. Rong được chiết trong dung môi ethanol có hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn so với chiết trong acetone (Trích dẫn: Nguyễn Thế Vương, 2009).

Tổng quan về vi khuẩn *Vibrio* sp. gây bệnh trên động vật thủy sản.

Đặc điểm chung của các vi khuẩn *Vibrio*: Gram âm, hình que thẳng hoặc hơi cong, kích thước 0,3-0,5 μm x 1,4-2,6 μm , không hình thành bào tử và chuyển động nhờ một tiêm mao hoặc nhiều tiêm mao mảnh, tất cả chúng đều yếm khí tùy tiện và hầu hết là oxy hóa và lên men trong môi trường O/F Glucose. Thiosulphate citrate bile salt agar (TCBS) là môi trường chọn lọc của *Vibrio*. Hầu hết các loài đều phát triển trong môi trường nước biển cơ bản, Na^+ kích thích cho sự phát triển của tất cả các loài *Vibrio*, chúng không phát triển trong môi trường không muối $NaCl$, chúng không sinh H_2S , miễn cảm với Vibriostat 2.4 diamino-6,7 diisopropyl pteridine phosphat (O/129). Cơ bản chúng sống trong môi trường nước biển và cửa sông (vùng nước lợ). (Nguyễn Thị Minh Trang, 2013) (trích dẫn bởi Nguyễn Thị Trúc Linh)

Tôm có sự thay đổi màu sắc và chuyển sang màu hồng nhạt khi cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh phát sáng (Bùi Quang tề, 2006) (trích dẫn bởi Nguyễn Thị Trúc Linh)

Đặng Thị Hoàng Oanh *et al.* (2006) trong nghiên cứu về xác định vị trí phân loại và khả năng kháng thuốc kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* phát sáng phân lập từ hậu ấu trùng tôm sú (*Penaeus monodon*) thu được kết quả kháng sinh đồ của 26 trong số 27 dòng vi

khuẩn phát sáng được thử với 6 loại thuốc kháng sinh thường dùng trong nuôi thủy sản cho thấy 100% số dòng vi khuẩn thử nghiệm kháng với ampicilin. Các dòng vi khuẩn phát sáng thử nghiệm mẫn cảm với chloramphenicol, norfloxacin và nitrofurantoin hơn so với tetracycline và trimethoprim/sulfamethoxazole. Phần lớn các dòng vi khuẩn thử nghiệm chỉ kháng với một loại kháng sinh (77%). Có khoảng 15% dòng vi khuẩn kháng với 2 loại kháng sinh và 4% kháng với 4 loại thuốc được thử. Có 4% số dòng vi khuẩn kháng với cả 6 loại kháng sinh thử nghiệm.

Các chủng vi khuẩn phát sáng có những đặc điểm hình thái điển hình của vi khuẩn giống *Vibrio*. Các đặc điểm đó là di động, cho phản ứng oxidase và catalase dương tính, là vi khuẩn Gram âm, hình que, có khả năng lên men glucose trong cả hai điều kiện hiếu khí và kỵ khí, tạo nitrit từ nitrat, mọc trên môi trường chọn lọc cho nhóm *Vibrio* (Thiosulfate-Citrate-Bile salts-Sucrose TCBS) và nhất là nhạy với hợp chất 2,4-diamino-6,7-diisopropyl pteridine (O/129,150 µg) là hợp chất giúp phân biệt vi khuẩn *Vibrio* và *Aeromonas*. Các chủng vi khuẩn phát sáng đều phát triển tốt ở môi trường có 3% NaCl, sinh indole và có khả năng tạo axit từ mannitol và trehalose (West *et al.*1986).

Một số bệnh do vi khuẩn *Vibrio* gây ra ở tôm

S	Tên bệnh	Giai đoạn tôm	Vi khuẩn gây bệnh	Tác hại
1	Bệnh phát sáng	ấu trùng, giống	<i>V.parahaemolyticus</i> <i>V.harveyi</i>	Gây chết hàng loạt
2	Bệnh đỏ dọc thân	Ấu trùng, giống	<i>V.alginolyticus</i>	Gây chết rải rác
3	Bệnh đỏ thân	Tôm thịt	<i>Vibrio</i> spp.	Gây chết rải rác
4	Bệnh vỏ hay ăn mòn kitin, đen mang	ở các giai đoạn của tôm cua	<i>Vibrio</i> spp., <i>Pseudomonas</i> <i>Proteus</i> sp.	spp., chết rải rác, hàng loạt
5	Nhiễm khuẩn ở cá	Cá nuôi ao, lồng	<i>Vibrio</i> spp.	chết rải rác

(Bùi Quang Tề, 2006)

Chen (1989) phân lập được trong gan tụy tôm sú có 18 loài *Vibrio* trong đó: *Vibrio harveyi* chiếm 26,9% và *V. splendidus* chiếm khoảng 0,5%. Hai loại này thường làm tôm bị chết nhiều, có lúc tới 100%, chúng có thể kháng lại 24 loại thuốc kháng sinh (Baticados *et al.*, 1991). Chỉ có một loại kháng sinh kiềm chế sự phát triển của hai loại *Vibrio* này. (trích dẫn bởi Nguyễn Thị Trúc Linh)

Nghiên cứu *Vibriosis* trên tôm thẻ chân trắng (*penaeus vanamei*)

Tôm thẻ chân trắng là một trong những đối tượng nhạy cảm với mầm bệnh *Vibriosis* ở một số quốc gia trên thế giới. Hiện tại, đã có nhiều nghiên cứu thí nghiệm về độc lực của các chủng *Vibrio* trên đối tượng này bằng một số phương pháp khác nhau đã được ghi nhận như cảm nhiễm bằng cách ngâm ấu trùng tôm thẻ chân trắng với *V. harveyi* và *V. campbellii* (Robertson *et al.*, 1998; Soto-Rodríguez *et al.*, 2006) và phương pháp tiêm trên tôm trưởng thành (Wanget *al.*, 2005). Tôm được gây cảm nhiễm trong các thí nghiệm này đều xảy ra hiện tượng chết cao (> 50%) trong thời gian 48 – 96 giờ tương ứng với mật độ vi khuẩn 10^5 CFU/ml đối với phương pháp ngâm và 10^4 CFU/ml đối với phương pháp tiêm. Hầu như không ghi nhận được bất kì dấu hiệu lâm sàng nào trên tôm cảm nhiễm trong các thí nghiệm nói trên nhưng khi tiến hành phân tích mô bệnh học trên các mẫu thì phát hiện được một số biến đổi mô học đặc trưng trên một số cơ quan gan tụy, mang và cơ quan lymphoid. Tôm nuôi nhiễm *Vibriosis* nói chung thường biểu hiện một số đặc điểm mô học đặc trưng như hiện tượng nhiễm khuẩn cục bộ trên các cơ quan, sau đó là sự tập trung của tế bào máu vây quanh các cụm vi khuẩn, kèm theo hiện tượng melamin hóa thường thấy trên cơ quan lymphoid, gan tụy, mang, mô liên kết mang, hệ thống tiêu hóa,.. (Lightner, 1996; Robertson *et al.*, 1998; Pitogo *et al.*, 1990). Các đặc điểm bệnh học tương tự cũng được ghi nhận khi gây cảm nhiễm *V. harveyi* lên tôm thẻ (*Penaeus semisulcatus*) với các mật độ vi khuẩn khác nhau (Mohajeri *et al.*, 2011) và trong thí nghiệm cảm nhiễm của Jayasree *et al.*, (2012) trên tôm sú với các chủng vi khuẩn phân lập được trên tôm bị hội chứng mềm vỏ. Bên cạnh đó, cũng ghi nhận được hiện tượng các tế bào máu bao vây các cụm vi khuẩn trên cơ quan lymphoid (Nash *et al.*, 1992) và hiện tượng mất các không bào trên vùng gan tụy, làm ảnh hưởng đến khả năng dự trữ lipid và glycogen của gan (Anderson *et al.*, 1988; Mohajeri *et al.*, 2011). (trích dẫn bởi Nguyễn Thị Trúc Linh)

2.2 Tình hình dịch bệnh trên tôm thẻ chân trắng

2.2.1 Tình hình dịch bệnh trên tôm thẻ chân trắng trên thế giới

So với tôm sú thì tôm thẻ chân trắng có nhiều ưu điểm hơn về chất lượng con giống vì loài này đã được gia hóa qua nhiều thế hệ để tạo được con giống chất lượng cao như tăng trưởng nhanh, chịu đựng tốt với môi trường và quan trọng là tôm sạch bệnh, kháng được một số bệnh đặc thù từ đó mà các nước trên thế giới tập trung nuôi đối tượng này. Tôm thẻ chân trắng được coi là loài có khả năng chống bệnh tốt hơn các loài tôm khác (Wyban and Sweeny, 1991). Mặc dù trong thực tế cũng thường xảy ra nhiều loại bệnh nhưng có những bệnh gây thiệt hại lớn như bệnh đốm trắng (WSSV), Taura (TSV), bệnh hoại tử cơ (IMNV) và hội chứng hoại tử cấp tính (AHPNS).

Năm 1992 dịch bệnh TSV lần đầu tiên xảy ra ở Ecuador (Lightner, 2011) và năm 1995 ở Trung Quốc (Rosenberry, 2002). Bệnh hoại tử cơ xuất hiện ở Brazil vào năm 2002 (Andrade, 2009). Bệnh đốm trắng xuất hiện ở Trung Quốc vào năm 1992 sau đó là các nước Châu Á .

Trong những năm gần đây thì bệnh hội chứng hoại tử cấp tính gây thiệt hại lớn cho nghề nuôi tôm thẻ chân trắng trên thế giới. Bệnh này xuất hiện ở Trung Quốc năm 2009, Việt Nam 2010, Thái Lan và Malaysia năm 2011 (Lightner, 2011) và Mexico năm 2013, còn ở các nước như Bangladesh, Ecuador, Ấn Độ và Indonesia chưa thấy xuất hiện bệnh này.

Tuy bệnh hội chứng hoại tử cấp tính đã xuất hiện nhiều năm nhưng tới tháng 6 năm 2013 thì Lightner và *ctv* tại Đại học Arizona mới phát hiện được tác nhân gây bệnh hội chứng hoại tử cấp tính AHPNS trên tôm là do một dòng đặc biệt của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* đã nhiễm bởi một loại virus được biết đến như một thể thực khuẩn (phage), virus này xâm nhiễm đã làm vi khuẩn sản xuất ra một loại độc tố cực mạnh gây rối loạn chức năng cơ quan tiêu hóa đặc biệt là hệ gan tụy của tôm, kết quả gan tụy sẽ bị hoại tử. Theo nhận định của các chuyên gia thủy sản trên thế giới hội chứng hoại tử cấp tính còn xuất hiện trong vài năm tới và hiện nay các nước đang tìm cách khắc phục bệnh này để duy trì nghề nuôi tôm phát triển bền vững (Trích dẫn: Châu Tài Tào, 2013).

2.2.2 Tình hình dịch bệnh trên tôm thẻ chân trắng ở Việt Nam

Năm 1990, Việt Nam có hơn 187.000 ha mặt nước nuôi tôm với sản lượng đạt được khoảng 31.000 tấn. Năm 1995, diện tích nuôi tăng lên 260.000 ha, sản lượng đạt được 52.000 tấn. Nhưng mặt trái của sự phát triển nhanh chóng, không quy hoạch đã dẫn đến dịch bệnh bùng phát ở nhiều nơi. Năm 1994, dịch bệnh bùng phát tại Đồng bằng sông Cửu Long: Trà Vinh, Bến Tre, Sóc Trăng, Long An, Nha Trang ... gây thiệt hại hàng chục tỷ đồng cho bà con nuôi tôm. Năm 1996, tại các tỉnh miền Nam (từ Phú Yên đến Cà Mau) dịch bệnh đã xảy ra trên 84.917 ha, trong đó nuôi quảng canh: 52.017 ha, quảng canh cải tiến: 29.011 ha, bán thâm canh: 3.829 ha. Tổng thiệt hại lên đến hàng chục tỷ đồng. Các tỉnh bị dịch bệnh nặng như Cà Mau hơn 70.000 ha, Kiên Giang hơn 4.000 ha, Bến Tre hơn 3.000 ha. Năm 1997, theo ước tính của Nguyễn Việt Thắng (báo cáo nghiên cứu khoa học) tỉnh Bến Tre bị thiệt hại nặng nề nhất với 20% tôm thả bị chết, Trà Vinh với hơn 15% tôm thả bị chết. Cũng trong thời gian này dịch bệnh bùng phát nghiêm trọng ở các tỉnh Miền Trung, đặc biệt vào tháng 2-3. Tổng số diện tích bị bệnh chiếm khoảng 80% tổng diện tích nuôi trồng gây thiệt hại lớn cho các tỉnh miền Trung.

Báo cáo kết quả Nuôi trồng thủy sản năm 2003 của ngành đã đưa ra kết quả: cả nước có 546.757 ha nuôi tôm nước lợ thương phẩm, trong đó diện tích bị bệnh khoảng 30.083 ha. Riêng các tỉnh thành ven biển từ Đà Nẵng đến Kiên Giang có tới 29.200 ha nuôi tôm bị chết, chiếm 97,06% diện tích có tôm bị chết trong cả nước. Các bệnh xảy ra với tôm chủ yếu là đốm trắng (WSSV), bệnh còi (MBV (Monodon Baculovirus)), bệnh do vi khuẩn *Vibrio*, bệnh do ký sinh trùng, gần đây xuất hiện thêm bệnh phân trắng, teo gan ở một vài nơi. Tại các tỉnh Bắc Trung Bộ, theo báo cáo của Viện nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản I cho thấy: Thanh Hóa có hơn 40% diện tích nuôi tôm bị nhiễm virus đốm trắng, tập trung ở vùng nuôi tôm công nghiệp như Khu công nghiệp Hoàng Phệ, với 70/110 ha nuôi tôm bị nhiễm bệnh. Nghệ An có 47,8% diện tích nuôi tôm nhiễm virus đốm trắng; 30,4% bệnh

MBV; 54,5% bệnh đầu vàng. Ở Hà Tĩnh, trong số 150 ha nuôi tôm bị bệnh, có 67 ha nhiễm bệnh virus đốm trắng, trong đó 27 ha có tôm nuôi chết hoàn toàn. Ở các tỉnh Quảng Bình, Quảng Trị, Thừa Thiên Huế, cũng có từ xấp xỉ trăm ha cho tới vài trăm ha nuôi tôm bị bệnh. Tại các tỉnh miền Trung, Nam Trung Bộ, theo Phòng bệnh học thủy sản -Trung tâm nghiên cứu Thủy sản III, Khánh Hòa có tỷ lệ diện tích nuôi tôm bị bệnh thấp nhất 14,3%, cao nhất ở Ninh Thuận 52,4%. Tỷ lệ nhiễm virus đốm trắng ở tôm nuôi tại khu vực này tuy có giảm nhưng bệnh phân trắng, teo gan lại xảy ra hầu hết ở các vùng nuôi trọng điểm như Ninh Hải, Phan Rang, Ninh Phước có những nơi lên tới 90-95% tôm bị nhiễm bệnh. Theo kết quả nghiên cứu của Viện nghiên cứu Nuôi trồng thủy sản II, tại các tỉnh Nam Bộ tỷ lệ nhiễm bệnh virus đốm trắng trên mẫu tôm ở ao nuôi quảng canh cải tiến chiếm tới 56%, 50% tôm nhiễm bệnh MBV.

Bệnh virus đốm trắng gây chết tôm hàng loạt, tác hại lớn đến năng suất, sản lượng tôm của khu vực. Năm 2007, dịch bệnh đã bùng phát trên hơn 30 ha ao nuôi tôm trên cát ở huyện Phù Mỹ (Bình Định). Tôm chết chủ yếu ở giai đoạn 30 - 40 ngày nuôi gây tổn thất hàng chục tỉ đồng. Năm 2005, vùng nuôi tôm trên cát trọng điểm tỉnh Bình Định tập trung tại hai xã Mỹ An, Mỹ Thắng (Phù Mỹ) cũng xảy ra dịch bệnh. Những tháng đầu năm 2008, một số tỉnh nuôi tôm ở Đồng Bằng Sông Cửu Long như: Kiên Giang, Bến Tre, Trà Vinh, Cà Mau bị thiệt hại nặng do tôm chết hàng loạt. Nghiêm trọng nhất tại Cà Mau có khoảng 34.000 ha tôm bị nhiễm bệnh, thiệt hại từ 10% đến 70%. Việc tăng trưởng quá nhanh chóng về diện tích nuôi tôm đã nảy sinh nhiều bất cập về ô nhiễm, kiểm soát dịch bệnh, chất lượng sản phẩm dẫn đến thiệt hại không nhỏ về kinh tế cũng như môi trường (Trích dẫn: Nguyễn Thế Vương, 2009).

2.3 Tình hình sử dụng thuốc, hóa chất trong nuôi trồng thủy sản

NTTS đang phát triển mạnh trên nhiều khía cạnh về cả diện tích, mức độ thâm canh. Loại hình nuôi, đầu tư cơ sở hạ tầng và chế biến sau thu hoạch. Việc sử dụng thuốc, hoá chất và chế phẩm sinh học trong nuôi trồng thủy sản có một đóng góp không nhỏ trong sự phát triển của ngành. Theo báo cáo trình bày kết quả điều tra hiện trạng các loại thuốc, hóa chất và chế phẩm sinh học dùng trong nuôi trồng thủy sản trên toàn quốc nhằm đề xuất một số giải pháp quản lý. Có ít nhất 373 loại hóa chất và CPSH được sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Trong đó có 14 loại hóa chất xử lý đất và nước, 6 chất gây màu nước, 86 loại chất khử trùng và diệt tạp, 138 kháng sinh, 47 loại CPSH (Mai Văn Tài và *ctv.*, 2004).

Sử dụng thuốc và hoá chất trong nghề nuôi tôm biển ngày càng gia tăng do sự chuyển đổi nhanh chóng từ nuôi quảng canh sang thâm canh. Kết quả điều tra 60 hộ nuôi tôm và người bán và phân phối thuốc và hóa chất ở tỉnh Sóc Trăng và Bạc Liêu cho thấy có 74 loại thuốc và hóa chất trong đó có 19 loại kháng sinh đang được dùng trong nghề nuôi tôm (Trích dẫn: Huỳnh Thị Tú và *ctv.*, 2006).

Theo Nguyễn Văn Nam và Phạm Văn Ty (2007) thì việc hình thành lớp bùn đáy do tích lũy dần các chất hữu cơ là nơi sinh sống của các vi sinh vật gây thối, vi sinh vật sinh các khí độc như amoniac, nitrit, hydrogen sulfur,... các vi sinh vật gây bệnh như *Virio*, *Aeromonas*, *E.Coli*,... nhiều loại nấm và nguyên sinh động vật. Thông thường các vi sinh

vật này có trong môi trường khi có sự mất cân bằng (phá vỡ) trong hệ vi sinh vật trong nước thì chúng sẽ tấn công vật chủ, ngoài ra khi môi trường bị ô nhiễm và tôm bị stress làm ảnh hưởng đến sức khỏe và khi có cơ hội thì sẽ bộc phát thành bệnh.

Tại Việt Nam thì hiện có trên 300 loại hóa chất và thuốc được sử dụng trong NTTS, đặc biệt trong nuôi thương phẩm có thể gây ra những tác động xấu đến môi trường nước và đến chất lượng tôm (Trích dẫn: Nguyễn Thị Phương Nga, 2004).

Thuốc và hóa chất có thể sử dụng một cách an toàn nếu tuân theo hướng dẫn sử dụng. Thuốc có thể an toàn đối với các trường hợp nhưng đôi khi lại có hại đối với một số trường hợp khác. Theo GESAMP (1997), trong nuôi quảng canh hoặc quảng canh cải tiến thì nhu cầu về thuốc là tối thiểu, chỉ giới hạn trong việc bón phân, xử lý đất hoặc nước (bón vôi), diệt tạp (dùng hạt trà hoặc dây thuốc cá). Nhưng trong các hình thức nuôi thâm canh hoặc bán thâm canh thì nhu cầu sử dụng thuốc chữa bệnh, chất phụ gia trong thức ăn, các hormon, thuốc trừ sâu để diệt kí sinh trùng nhiều hơn (Trích dẫn: Lê Kiều Lam, 2011).

2.4 Tình hình nghiên cứu và sử dụng các loại thảo dược trong phòng trị bệnh ở động vật thủy sản tại Việt Nam.

Từ xa xưa, dân ta đã biết dùng những cây cỏ quen thuộc trong vườn nhà để trị các bệnh thông thường như một số bệnh đường ruột, bệnh đường hô hấp, tiết niệu, trị mụn nhọt, rửa vết thương,...

Theo y học cổ truyền, phần lớn những cây thuốc có tác dụng chữa bệnh nhiễm khuẩn đã được xếp trong nhóm thuốc thanh nhiệt giải độc, thanh nhiệt, táo thấp, thuốc khử hàn,.... như alicin trong tỏi, odorin trong hẹ,...

Từ thế kỷ XIV, Đại y thiên sư Tuệ Tĩnh đã sử dụng nhiều thảo mộc như tỏi, hẹ, tô mộc, hạt cải, trầu không... để trị một số bệnh viêm nhiễm.

Từ giữa thế kỉ XX, theo kết quả nghiên cứu của Phạm Văn Ngữ (1956) trên 500 loài cây thuốc, đã khẳng định rằng nhiều cây có tác dụng kháng khuẩn rất lớn. Theo kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Hương và ctv (1959), trên 1000 cây thuốc, chỉ ra rằng kháng sinh thực vật sử dụng rất an toàn, có tác dụng mạnh, nhóm nghiên cứu đã đưa ra chế phẩm cây tô mộc trị bệnh tiêu chảy.

Ở Miền Bắc, Hà Ký (1995) và ctv trong chương trình KN 04 - 12 đã nghiên cứu một số loài thảo dược dùng để phòng trị bệnh trên cá. Bước đầu đã chọn được 9 loài cây thuốc sau: Rau ngổ (*Polygonum hydropiper*), rau sam (*Portulaca cleracea*), cây cỏ sữa lá to (*Euphorbia hirta*), cỏ sữa lá nhỏ (*Euphorbia thymifolis*), sài đất (*Wedelia calendulae*), nhọ nồi (*Eclipta alba*), bồ công anh (*Lactuca indica*), cây vôi voi (*Heliotropium indicum*), cây chó đẻ răng cưa (*Phyllanthus urinaria*) có thể sử dụng trong phòng trị bệnh trên động vật thủy sản.

Ở miền Nam, các cây cỏ được dùng trong phòng trị bệnh cho vật nuôi thủy sản chủ yếu từ kinh nghiệm dân gian người dân đã biết dùng cây cỏ mực (*Eclipta alba*), cây trầu (*Piper betel*) để trị bệnh kí sinh trùng cho động vật thủy sản, một số địa phương khác theo kinh nghiệm người dân cũng biết dùng một số loài thực vật quen thuộc để chữa bệnh cho

tôm cá đem lại hiệu quả như ở Nghệ An, Huế. Ngoài ra một số địa phương dùng cây tỏi (*Allium sativum*) để phòng, trị bệnh cho động vật thủy sản.

Bùi Quang Tề, Lê Xuân Thành và cộng tác viên đã nghiên cứu thành công hai loại chế phẩm thảo dược VTS1-C, VTS1-T phối chế từ các hoạt chất chiết tách từ tỏi (*Allium sativum*), sài đất (*Weledia calendulacea*) sử dụng phòng bệnh cho tôm cá, kết quả cho thấy tỏi, sài đất đều có tác dụng với cả 6 loài vi khuẩn: *Vibrio parahaemolyticus*, *V.harveyi*, *V.alginolyticus*, *Aeromonas hydrophyla*, *Edwardsiella tarda* và *Hafnia alvei* gây bệnh ở nước ngọt, nước lợ mặn.

Nghiên cứu khác của Phan Xuân Thanh (năm 2002) đã xác định được chất 2-hydroxy-6-pentadecatrienylbenzoat có nguồn gốc từ thảo dược, có tác dụng phòng trừ các bệnh do vi khuẩn và nấm gây ra. Nhằm mục đích sử dụng các hoạt chất sinh học thay thế các hoá chất độc hại, kháng sinh bị cấm sử dụng trong lĩnh vực nuôi trồng thủy sản.

Gần đây khi nghiên cứu khả năng kháng nấm của dịch chiết lá trà, Nguyễn Ngọc Phước và *ctv* (2006) kết luận chiết xuất từ lá trà có khả năng tiêu diệt các loài nấm thuộc họ Lagenladium, chủng nấm này gây bệnh phổ biến trên tôm nước lợ, mặn. Dịch chiết lá trà có khả năng ức chế, tiêu diệt các loại vi khuẩn *Aeromonas hydrophyla* và *Vibrio sp.*

Năm 2008, Nguyễn Anh Tuấn đã nghiên cứu khả năng kháng khuẩn của dịch chiết tỏi và lá húng đối với vi khuẩn *Aeromonas* gây bệnh đốm đỏ ở cá Trắm Cỏ tại Thừa Thiên Huế và cộng sự đã nghiên cứu thử nghiệm. (Trích dẫn: Nguyễn Thế Vương, 2009).

Trong một nghiên cứu vào năm 2006, Nguyễn Viết Khuê và *ctv* cho thấy trong số những người được phỏng vấn có 41,33% người nuôi sử dụng thảo dược, phổ biến là tỏi và lá xoan, 15% dùng không hiệu quả, 85% đạt hiệu quả từ ít đến nhiều.

Năm 2006 đã tiến hành thử nghiệm ngoài thực địa 2 loại thảo dược BecaNor TD1 và BecaNor TD 2 tại 3 tỉnh Quảng Ninh, Nam Định, Hà Giang phòng bệnh cho cá trắm cỏ, hàng tháng cho cá ăn dược thảo với liều lượng 7g/ kg thức ăn. Kết quả thu được cho thấy tại 2 tỉnh Quảng Ninh và Nam Định, cá trắm cỏ cho ăn thuốc phòng đã không nhiễm bệnh trong khi đó ở các lô đối chứng vẫn có hiện tượng cá chết do nhiễm bệnh vi khuẩn. Tại tỉnh Hà Giang, tỷ lệ chết giảm từ 100% xuống còn 40% khi cho cá ăn thuốc phòng (Nguyễn Thị Hà và *ctv*, 2006).

Tuy nhiên, việc thử nghiệm chưa được thực hiện trên diện rộng nên chưa khẳng định được hiệu quả của các dược thảo này đồng thời chưa được áp dụng rộng rãi (Trích dẫn: Phạm Văn Thư, 2006).

Năm 2007, Nguyễn Ngọc Phước và *ctv* đã tiến hành nghiên cứu sử dụng lá trà không để trị bệnh do nấm, vi khuẩn gây ra trên đối tượng nuôi động vật thủy sản. Bước đầu đã có kết quả tốt ở quy mô phòng thí nghiệm.

Nghiên cứu khả năng sử dụng rong bún (*Enteromorpha spp.*) làm thức ăn cho cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) được thực hiện gồm 7 nghiệm thức với ba lần lặp lại. Rong bún tươi và khô được sử dụng làm nguồn thức ăn thay thế thức ăn viên với phương thức cho ăn luân phiên. Mỗi ngày cá được cho ăn hoặc là thức ăn viên hoặc là rong bún: (1) thức ăn viên mỗi ngày là nghiệm thức đối chứng; (2) và (3) rong bún tươi hoặc rong bún khô

mỗi ngày; và 2 chế độ cho ăn luân phiên gồm (4) và (5) 1 ngày thức ăn viên và 1 ngày rong bún tươi hoặc khô; (6) và (7) 1 ngày thức ăn thức ăn viên và 2 ngày rong bún tươi hoặc khô. Cá có khối lượng trung bình là 3,04 g được nuôi trong bể composit 120 L, ở độ mặn 5‰ với mật độ 30 con/bể. Sau 6 tuần nuôi, tỷ lệ sống của cá thí nghiệm không bị ảnh hưởng bởi nghiệm thức thức ăn, dao động từ 81,0 đến 85,7%. Tốc độ tăng trưởng của cá ở nghiệm thức cho ăn xen kẽ 1 ngày thức ăn và 1 ngày rong bún tươi hoặc khô khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng. Áp dụng cho ăn kết hợp thức ăn viên và rong bún, hệ số tiêu tốn thức ăn của thức ăn viên có thể giảm từ 52,6 đến 61,5%. Thành phần sinh hóa của thịt cá sau khi thí nghiệm gồm hàm lượng protein và photpho không khác nhau giữa các nghiệm thức. Ở nghiệm thức đối chứng, hàm lượng lipid, tro và canxi thấp hơn có ý nghĩa so với các nghiệm thức khác ($P < 0,05$). Kết quả cho thấy rong bún tươi và khô có thể sử dụng làm thức ăn thay thế một phần thức ăn thương mại trong nuôi cá rô phi. Ngoài ra, sử dụng rong bún làm nguồn thức ăn có thể cải thiện chất lượng nước trong bể nuôi (Nguyễn Thị Ngọc Anh, 2014).

Nhóm nghiên cứu Nguyễn Thị Ngọc Anh và ctv (2013). Trường đại học Cần Thơ đã nghiên cứu sử dụng rong bún (*Enteromorpha sp.*) làm thức ăn cho cá nâu (*Scatophagus argus*). Kết quả nghiên cứu cho thấy rong bún có thể được sử dụng thay thế một phần thức ăn viên, góp phần cải thiện chất lượng nước, giảm chi phí thức ăn và nâng cao thu nhập cho người nuôi.

Rong bún có trong tự nhiên với sinh lượng rất lớn trong các thủy vực nước lợ (ao quảng canh, kênh tự nhiên...) ở các tỉnh đồng bằng sông Cửu Long. Cá nâu có giá trị kinh tế khá cao, được thị trường trong nước ưa chuộng, dễ nuôi, và được nuôi phổ biến trong các mô hình quảng canh kết hợp với các đối tượng khác ở vùng nước lợ. Kết quả nghiên cứu về dinh dưỡng cá nâu đã tìm thấy thành phần thức ăn trong dạ dày của cá nâu gồm mùn bã hữu cơ, rong, tảo... trong đó, rong *Enteromorpha* và *Chaetomorpha* là phổ biến nhất. Nếu sử dụng rong bún thay thế được một phần thức ăn viên cho cá nâu sẽ góp phần giảm chi phí thức ăn và nâng cao lợi nhuận, đồng thời khuyến khích nông hộ sử dụng nguồn rong bún sẵn có tại địa phương làm thức ăn cho tôm, cá.

Nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ sống, tăng trưởng và năng suất cá nâu nuôi trong ao có rong bún được cho ăn thức ăn mỗi ngày 2 lần và mỗi ngày 3 lần, không khác biệt so với ao nuôi không có rong bún và cho ăn thức ăn viên mỗi ngày. Hàm lượng thức ăn và NO_2 trong ao nuôi cá nâu có rong bún thấp hơn so với ao không có rong bún. Thành phần sinh hóa (hàm lượng nước, protein, tro, Ca và P) của thịt cá nâu không bị ảnh hưởng bởi nghiệm thức thức ăn. Riêng hàm lượng lipid của thịt cá nâu ở ao nuôi có rong bún thấp hơn ở ao nuôi chỉ cho ăn thức ăn viên.

Nuôi cá nâu trong ao đất cho ăn thức ăn viên kết hợp với rong bún giảm được chi phí thức ăn từ 49,65 – 61,36%. Do đó, lợi nhuận và hiệu quả sử dụng đồng vốn cao hơn so với chỉ cho ăn thức ăn viên. Nuôi cá nâu trong ao nước lợ, nơi có rong bún hiện diện tự nhiên có thể áp dụng cho các hộ dân vùng nước lợ đồng bằng sông Cửu Long.

Đặng Xuân Cường và *ctv* (2013) đã nghiên cứu sàng lọc hoạt tính kháng oxy hóa của 5 loại rong mơ thu ở tỉnh Khánh Hòa gồm có *S.angustifolium*, *S.aemulum*, *S.assimile*, *S.feldmanii* và *S.ilicifolium*. Kết quả nghiên cứu này cho thấy hàm lượng phlorotannin/polyphenol và khả năng chống oxy hóa của rong *S. angustifolium* là cao nhất.

Huỳnh Trường Giang và *ctv* (2013) đã nghiên cứu xác định được thành phần hóa học, hoạt tính chống oxy hóa của hỗn hợp polysaccharide trích từ rong mơ *S.microcystum*. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng polysaccharide ly trích từ rong mơ *S.microcystum* có khả năng chống oxy hóa mạnh. Tác giả đề nghị rằng polysaccharide từ rong mơ có thể nghiên cứu ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản tăng cường miễn dịch cho tôm cá nuôi.

Yousif et al. (2004), được trích bởi Phạm Kim Ngân. Thử nghiệm rong bún (*Enteromorpha sp.*) làm thức ăn cho cá diếc (*Siganus canaliculatus*), kết quả cho thấy tăng trưởng của nhóm cá được bổ sung 10% bột rong bún vào khẩu phần ăn tương tự với nghiệm thức đối chứng. Bên cạnh đó, tỉ lệ sống và tăng trưởng của cá tốt nhất được tìm thấy ở nhóm cá được cho ăn thức ăn đối chứng kết hợp với rong bún tươi.

Nghiên cứu của Trần Kim Thêu (2011) về “Ảnh hưởng của các loài rong biển khác nhau lên môi trường sống, tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm sú”. Kết quả cho thấy mô hình nuôi kết hợp tôm sú với rong bún, giúp làm tăng tỉ lệ sống tăng tốc độ tăng trưởng và làm giảm hệ số tiêu tốn thức ăn của tôm sú.

Nghiên cứu Phạm Kim Ngân (2012) về “Đánh giá khả năng thay thế đạm bột cá bằng đạm bột rong bún (*Enteromorpha sp.*) trong ương cá kèo (*Pseudapocrytes elongates*) giống. Kết quả cho thấy đạm bột rong bún có thể thay thế 40% đạm bột cá trong chế biến thức ăn để ương nuôi cá kèo giống ở độ mặn 10‰, giúp làm tăng tỉ lệ sống, tăng tốc độ tăng trưởng và làm giảm hệ số tiêu tốn thức ăn của cá kèo giống.

PHẦN 3. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1 Dụng cụ - Hóa chất - Môi trường

Dụng cụ thí nghiệm

Tủ âm, Tủ sấy, Nồi khử trùng mini, Tủ cấy; máy vortex; kính hiển vi; que cấy; bộ tiểu phẫu: kéo, pen, khay đựng mẫu, khay đựng eppendorf, đĩa petri thủy tinh, lam, lamel, đầu col nhựa, giấy cuộn paraffin, que cấy vòng, que cấy thẳng, que thủy tinh, khẩu trang, găng tay, giấy vệ sinh, cân điện tử, pipet, giấy bạc, ống nghiệm, giá để ống nghiệm...

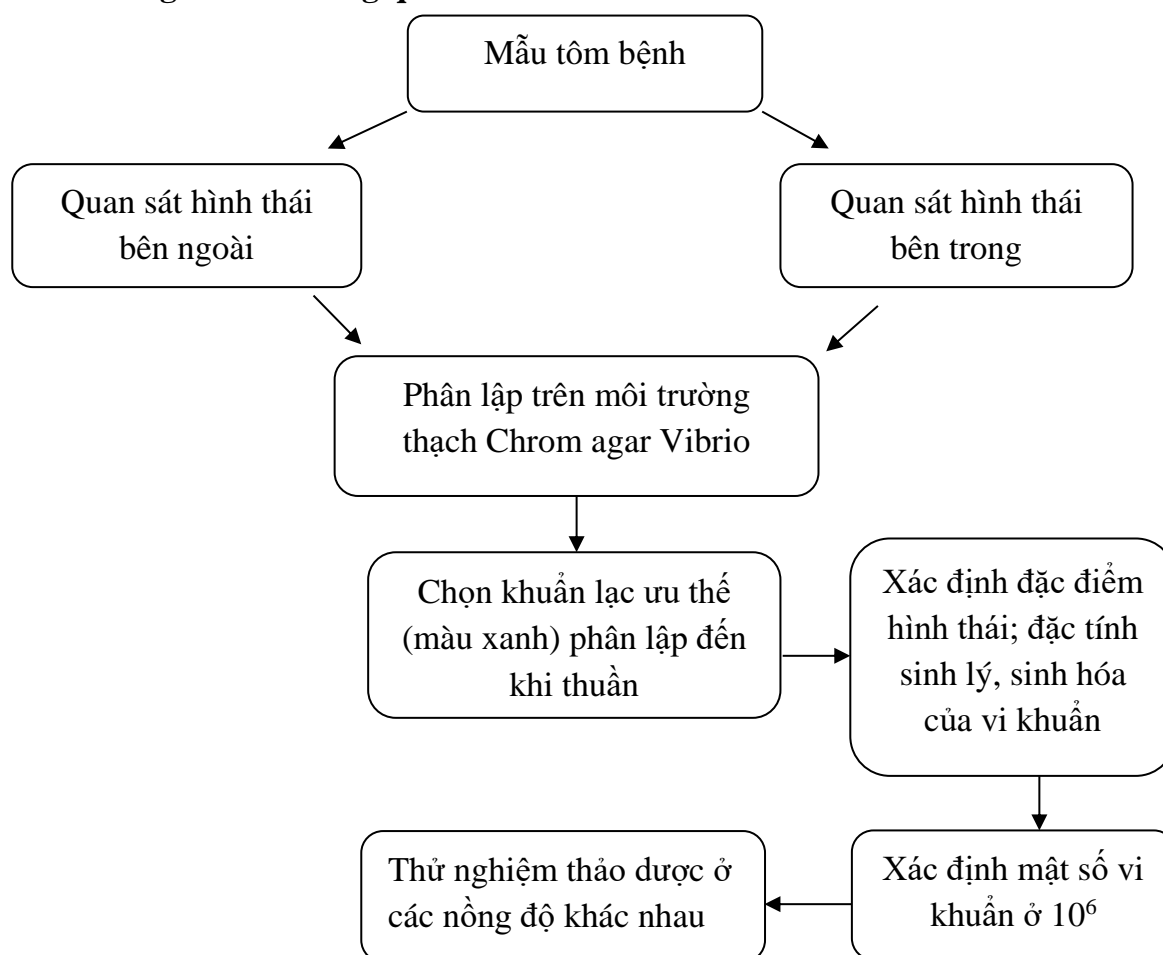
Môi trường - hóa chất

Môi trường Chrom agar Vibrio, môi trường NB, môi trường BHIA, nước cất, NaCl 0,85%, cồn.

Thuốc dùng nhuộm Gram, bột rong bún

3.2 Phương pháp nghiên cứu

3.2.1 Sơ đồ nghiên cứu tổng quát



Hình 3.1: Sơ đồ nghiên cứu tổng quát

3.2.2 Phương pháp thu mẫu

Phương pháp thu mẫu rong

Địa điểm thu mẫu

Rong bún (*Enteromorpha intestinalis*), được thu ở Cầu Ngang Trà Vinh.

Cách thu mẫu

Thu mẫu rong từ các ao cho vào bao bì, vận chuyển về phòng nghiên cứu bệnh học thủy sản. Rửa rong bằng nước ngọt, loại bỏ những phần rong hư và sỏi, cho rong vào sọt để cho ráo nước cân trọng lượng rong tươi, phơi khô rong. Khi rong khô cân trọng lượng rong tính lượng rong hao khi phơi khô.



Hình 3.2: Thu rong



Hình 3.3: Phơi rong

Phương pháp thu mẫu tôm

Mẫu tôm bệnh đường ruột, phân trắng được thu trực tiếp tại ao nuôi tôm của người dân. Quan sát và ghi nhận hình thái bên ngoài của tôm, chú thích số mẫu thu, tên và địa chỉ của chủ hộ. Cho tôm vào keo nhựa và trữ trong thùng đá. Vận chuyển mẫu về phòng nghiên cứu bệnh học thủy sản tại Trường Đại Học Trà Vinh, khoa Nông Nghiệp – Thủy Sản.

Các ao nuôi tôm có triệu chứng bệnh đường ruột, phân trắng được thu trực tiếp tại các ao nuôi tôm của người dân, tổng số ao thu được là 20 ao. Mỗi ao thu từ 5-6 con tôm thẻ chân trắng.



Hình 3.4: Chuẩn bị dụng cụ thu mẫu



Hình 3.5: Thu mẫu tôm bệnh

3.2.3 Phương pháp nuôi cấy phân lập vi khuẩn

Phương pháp phân lập xác định vi khuẩn gây bệnh dựa trên phương pháp Frerichs và Millar (1993) Cowan và Steel (1993).

Phương pháp nuôi cấy phân lập

Quan sát và ghi nhận hình thái bên ngoài, bên trong của tôm bị bệnh

Dùng que cấy đã khử trùng trên ngọn đèn cồn (để nguội) nhúng vào mẫu gan của tôm có dấu hiệu bệnh để có được vi khuẩn, ria các đường cấy trên môi trường đĩa thạch Chrom agar Vibrio (thao tác trên ngọn đèn cồn) lật ngược đĩa lại cho vào túi nilong, ủ trong tủ ẩm ở nhiệt độ 35⁰C trong 24 giờ đọc kết quả và chọn khuẩn lạc ưu thế (màu xanh) tiếp tục phân lập trên đĩa thạch Chrom agar Vibrio mới đến khi khuẩn lạc thuần.



Hình 3.6: Tôm bệnh

Hình 3.8: Đĩa khuẩn lạc thuần

Hình 3.7: Cấy mẫu tôm trên môi trường Chrom agar Vibrio

3.2.4 Phương pháp xác định đặc điểm hình thái; đặc tính sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn.

3.2.4.1 Phương pháp xác định đặc điểm hình thái của vi khuẩn

a. Nhuộm Gram:

Mục đích của nhuộm Gram để quan sát hình dạng và xác định vi khuẩn thuộc nhóm Gram âm (-) hay Gram dương (+). Thông thường vi khuẩn có hình dạng như sau: hình cầu, hình chuỗi, que ngắn, que dài, hình cong.

Cách nhuộm Gram: (Xem phần phụ lục C)

b. Tính di động:

Dùng để kiểm tra khả năng di chuyển độc lập của vi khuẩn.

Nhiều loài vi khuẩn có khả năng di chuyển nhờ tiêm mao. Sự di động này có thể quan sát dưới kính hiển vi bằng phương pháp giọt treo ở vật kính 40X để xác định khả năng di động của vi khuẩn.

Phương pháp (Xem phần phụ lục D)

3.2.4.2 Phương pháp xác định đặc tính sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn.

❖ Phản ứng Oxidase

Phương pháp

Chạm nhẹ que cấy đã tiệt trùng vào một khuẩn lạc trên đĩa Chrom Agar. Sau đó tán đều vi khuẩn lên giấy thử Oxidase.

Quan sát giấy thử Oxidase trong 30 giây và ghi nhận sự thay đổi màu sắc.

Kết quả:

Nếu giấy thử Oxidase chuyển màu cho phản ứng Oxidase dương tính(+) và ngược lại không có hiện tượng chuyển màu thì phản ứng Oxidase âm tính(-).

❖ Phản ứng Catalase

Phương pháp:

- Nhỏ một giọt dung dịch 3% H₂O₂ lên miếng lam.
- Dùng que cấy đã tiệt trùng lấy một ít vi khuẩn cho vào dung dịch 3% H₂O₂.

Kết quả:

Vi khuẩn cho phản ứng Catalase dương tính (+) sẽ gây hiện tượng sủi bọt trong dung dịch 3 % H₂O₂ và ngược lại không sủi bọt cho phản ứng âm tính (-).

❖ **Phương pháp định danh vi khuẩn bằng bộ kit API 20E**

(Xem phần phụ lục E)

Phương pháp thu bột rong bún

Rong bún khi đã rửa sạch bằng nước ngọt, phơi khô, đem xay nhuyễn bằng máy nghiền



Hình 3.9: Cân rong đã phơi khô



Hình 3.10: Nghiền rong

3.2.5 Xác định khả năng kháng khuẩn của rong bún đối với vi khuẩn *Vibrio harveyi* bằng phương pháp bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch (Ariole và Nyeche, 2013).

Chuẩn bị: đĩa môi trường BHIA+2% NaCl; đầu col vàng; que cấy; đèn cồn, bột rong bún, ống nghiệm chứa dung dịch huyền phù có mật độ vi khuẩn 10⁶ CFU/ml...

Cách thực hiện:

Pha dịch chiết thảo dược: cân 1 gram bột rong bún cho vào 5ml nước cất, sau đó đem đi vortex.

Dùng bút lông ghi tên mẫu, chấm 5 lỗ trên đĩa sau đó kí hiệu rong bún, nước cất (đối chứng).

Dùng pipet hút 100µl dung dịch huyền phù (vi khuẩn *vibrio harveyi*) trải đều trên đĩa môi trường thạch BHIA + 2% NaCl sau đó cho đĩa vừa trải cho vào ngăn mát của tủ lạnh khoảng 15 phút, sau 15 phút lấy đĩa ra rồi dùng đầu col vàng đục 5 lỗ trên đĩa thạch BHIA + 2% NaCl tạo các giếng có đường kính mỗi lỗ 6mm (4 lỗ cho dịch chiết thảo dược rong bún, 1 lỗ cho nước cất vô trùng vào làm đối chứng). Sau đó dùng micropipet 100µl dịch chiết thảo dược rong bún, (nồng độ 200mg/ml) và 100µl nước cất bơm vào các lỗ thạch tương ứng đã kí hiệu trên đĩa. Ủ trong tủ ấm ở nhiệt độ 35⁰C trong 24 giờ.

Đọc kết quả:

Sau 24 giờ đem đĩa petri ra quan sát và ghi nhận khả năng kháng khuẩn thông qua sự hình thành vòng vô khuẩn và đường kính của vòng vô khuẩn bằng cách đo đường kính của vòng vô khuẩn. Theo Sivakumar et al. (2012), vòng kháng vô trùng được chia thành 3 loại:

- “+” : Vòng kháng vô trùng 8-12 mm.
- “++” : Vòng kháng vô trùng > 12- 15mm.
- “+++” : Vòng kháng vô trùng > 15mm.

Sau khi xác định được có khả năng kháng khuẩn tiến hành xác định MIC (CLSI, 2010). (Trích dẫn : Châu Hồng Thúy, 2016).

3.2.6 Xác định khả năng kháng khuẩn của rong bún đối với vi khuẩn *vibrio harveyi* bằng phương pháp MIC (Minimum Inhibitory Concentration).

Phương pháp xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC): MIC (Minimal inhibitory concentration) được xác định bằng phương pháp pha loãng thuốc trong môi trường lỏng, theo tiêu chuẩn của Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010 (CLSI M49-A).

Xác định mật độ vi khuẩn

Khi vi khuẩn đã thuần, lấy một ít khuẩn lạc rời trên đĩa Chrom agar *Vibrio* cho vào ống nghiệm chứa 10ml nước muối sinh lý vô trùng.

Phương pháp so màu: Dùng độ đục chuẩn McFarland 3 để so màu xác định mật số vi khuẩn. Độ đục chuẩn McFarland 3 có mật số vi khuẩn khoảng 10^8 CFU/ml.

Dung dịch huyền phù vi khuẩn trong hơn với độ đục chuẩn McFarland 3 thì thêm vào một ít vi khuẩn. Nếu dịch huyền phù (vi khuẩn *vibrio harveyi*) có độ đục hơn độ đục chuẩn McFarland 3 thì thêm nước muối sinh lý.

Dùng pipet hút 1ml dung dịch huyền phù chứa vi khuẩn với mật độ vi khuẩn 10^8 CFU/ml cho vào ống nghiệm chứa 9 ml nước muối sinh lý để đạt độ pha loãng 10 lần. Tiếp tục pha loãng cho đến khi đạt mật độ vi khuẩn cần thí nghiệm. Mật độ vi khuẩn cần thí nghiệm là 10^6 CFU/ml.

Pha dịch chiết thảo dược

Rong bún được pha bằng nước cất vô trùng

Cách pha như sau:

Cân 1g bột rong bún cho vào ống nghiệm chứa 5ml nước cất vô trùng. Nồng độ thảo dược ban đầu là 200mg/mL, sau đó hút 5ml dung dịch từ ống nghiệm ban đầu cho vào ống nghiệm thứ 2 chứa 5ml nước cất vô trùng ta được nồng độ thảo dược 50% tiếp tục pha loãng giống cách làm như trên để được các ống nghiệm có nồng độ tiếp theo.

Các nồng độ thảo dược thí nghiệm là: 200 mg/ml; 100mg/ml; 50 mg/ml; 25 mg/ml

3.3.7.3 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC)

Thí nghiệm được lặp lại 3 lần với 4 nồng độ dịch chiết thảo dược, thí nghiệm được pha loãng trong ống nghiệm cùng với 3 đối chứng âm và 1 đối chứng dương được lặp lại mỗi nồng độ thảo dược.

Nghiệm thức 1: chứa 3ml vi khuẩn *vibrio harveyi* có mật độ vi khuẩn 10^6 CFU/ml + 3 ml dịch chiết thảo dược nồng độ 200mg/ml.

Nghiệm thức 2: chứa 3ml vi khuẩn *vibrio harveyi* có mật độ vi khuẩn 10^6 CFU/ml + 3 ml dịch chiết thảo dược nồng độ 100 mg/ml.

Nghiệm thức 3: chứa 3ml vi khuẩn *vibrio harveyi* có mật độ vi khuẩn 10^6 CFU/ml + 3 ml dịch chiết thảo dược nồng độ 50 mg/ml.

Nghiệm thức 4: chứa 3ml vi khuẩn *vibrio harveyi* có mật độ vi khuẩn 10^6 CFU/ml + 3 ml dịch chiết thảo dược nồng độ 25 mg/ml.

Mỗi nồng độ pha loãng có 2 nghiệm thức đối chứng:

Đối chứng âm (-) : chứa 3ml thảo dược + 3ml nước cất.

Đối chứng dương (+) : chứa 3ml vi khuẩn *vibrio harveyi* có mật độ vi khuẩn 10^6 CFU/ml + 3ml nước muối sinh lý.

Ủ tất cả các nghiệm thức vào trong tủ ấm ở nhiệt độ 35°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ đọc kết quả.

Đọc kết quả

Đọc kết quả MIC: Sau 24 giờ đem tất cả các ống nghiệm đã làm MIC pha loãng với nước muối sinh lý đã tiệt trùng, pha loãng ra 10 lần sau đó dùng micropipet hút 100 μ l dung dịch trong tất cả các ống nghiệm vừa pha loãng trải trên môi trường Chrom agar Vibrio. Tương ứng với 3 lần lặp lại. Sau đó đem đĩa vừa trải cho vào tủ ấm ở nhiệt độ 35°C trong 24 giờ. Sau 24 giờ đọc kết quả. Ống nghiệm đầu tiên không có vi khuẩn phát triển khi trải lên môi trường Chrom agar Vibrio thì nồng độ ở ống nghiệm đó là nồng độ ức chế tối thiểu của thảo dược trên vi khuẩn.

Sau 24 giờ đếm mật số vi khuẩn có trên từng đĩa rồi so sánh. Trường hợp quan sát trên đĩa thấy có tạp khuẩn thì loại bỏ kết quả hoặc trên đĩa có vi khuẩn phát triển không liên tục thì làm lại kết quả.

Thử nghiệm khả năng miễn dịch của tôm khi cho tôm ăn bột rong bún sau đó gây cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi*.

1. Thí nghiệm cảm nhiễm trên tôm:

Thí nghiệm được bố trí trong bể kính chứa 20 L nước có độ mặn 15‰ với 3 lần lặp lại và 4 nghiệm thức: nghiệm thức 1: nghiệm thức đối chứng không bổ sung vi khuẩn *Vibrio harveyi*; nghiệm thức 2: nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi* với mật số 10^4 CFU/mL; nghiệm thức 3 nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi* với mật số 10^5 CFU/mL; và nghiệm thức 4 nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi* với mật số 10^6 CFU/mL. Trước khi cảm nhiễm, tôm được dưỡng trong bể 3 ngày cho quen với điều kiện môi trường. Sau đó tiến hành cảm nhiễm. Tôm cảm nhiễm được bố trí 60 con/nghiệm thức, chia thành 3 keo để ngâm tôm. Mỗi keo cho vào 1 L nước thí nghiệm và 20 con tôm, tiếp theo đổ vi khuẩn *Vibrio harveyi* đã được nuôi sau 18 giờ và điều chỉnh về mật số 2×10^8 CFU/mL vào keo nhựa có sục khí với thể tích như sau: Nghiệm thức 1 không bổ sung vi khuẩn chỉ cho 1L nước thí nghiệm vào ngâm tôm; nghiệm thức 2 cho 5 mL dung dịch vi khuẩn *Vibrio harveyi* vào keo để ngâm tôm; nghiệm thức 3 cho 50 mL dung dịch vi khuẩn vào keo; nghiệm thức 4 cho 500 mL dung dịch vi khuẩn vào keo có sục khí. Mỗi keo ngâm 15 phút sau đó cho tôm và cả vi khuẩn trong keo nhựa cho vào từng bể thí nghiệm có chứa 19L nước.

Thí nghiệm được bố trí trong thời gian 14 ngày, không thay nước trong 3 ngày đầu cảm nhiễm. Các ngày tiếp theo thay 30% lượng nước nuôi. Thức ăn cho tôm ăn là thức ăn công nghiệp 40% CP, cho ăn theo nhu cầu.



Hình 3.11 Xác định LD50

Các chỉ tiêu theo dõi:

Theo dõi và ghi nhận số tôm chết của từng nghiệm thức thí nghiệm ở từng mốc thời gian

Tiến hành thu mẫu và phân tích mô bệnh học sau 5 và 14 ngày cảm nhiễm. Cách thu mẫu bằng cách bắt ngẫu nhiên 3 con tôm từ mỗi nghiệm thức thí nghiệm để phân tích mô bệnh học.

Xác định khả năng miễn dịch của tôm khi cho ăn thức ăn có bổ sung bột rong bún trong điều kiện *in vivo*

Bố trí thí nghiệm:

Thí nghiệm một nhân tố được bố trí với 3 lần lặp lại trong bể kính chứa 20 L nước nuôi tôm có độ mặn 15‰ và sục khí. Thí nghiệm gồm 4 nghiệm thức: Nghiệm thức 1 (đối chứng âm): cho tôm ăn thức ăn không bổ sung chất chiết rong bún và cũng không cảm nhiễm *Vibrio harveyi*, Nghiệm thức 2 (đối chứng dương) cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi* với liều gây chết 50% và không cho tôm ăn thức ăn bổ sung chất chiết rong bún, nghiệm thức 3: cho tôm ăn thức ăn có bổ sung chất chiết rong bún với nồng độ MIC và cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi*, và nghiệm thức 4 cho tôm ăn thức ăn có bổ sung chất chiết rong bún với nồng độ 2MIC và cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi*. Mỗi bể kính bố trí 20 con tôm khỏe có kích cỡ trung bình 1gam/con. Trước khi bố trí thí nghiệm dưỡng tôm một tuần cho tôm quen với điều kiện môi trường. Đối với nghiệm thức 3 và 4 tiến hành cho tôm ăn chất chiết rong bún 1 tuần sau đó tiến hành cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi* với mật số gây chết 50% (LD₅₀). Sau đó, tiến hành cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio harveyi* ở nghiệm thức 2, 3 và 4 với liều gây chết 50%. Thí nghiệm được bố trí trong thời gian 20 ngày, không thay nước trong 4 ngày đầu cảm nhiễm. Các ngày tiếp theo thay 30% lượng nước nuôi.



Hình 3.12 Bố trí thí nghiệm

Các chỉ tiêu theo dõi:

1. Đếm số lượng vi khuẩn *Vibrio harveyi* trong ruột tôm bằng phương pháp trải mẫu vào đĩa môi trường Chrom agar với tần xuất 5 ngày/lần bằng cách thu mẫu ngẫu nhiên mỗi bể là 3 con.
2. Đếm số lượng vi khuẩn *Vibrio harveyi* trong nước ngày/lần trong 3 ngày đầu bằng cách trải đều mẫu nước trên đĩa chrom agar. Từ ngày thứ 4 trở đi đếm số lượng *Vibrio harveyi* 5 ngày/lần.
3. Quan sát và ghi nhận các dấu hiệu bất thường của tôm.
4. Các yếu tố môi trường pH, nhiệt độ, độ mặn, NO₂, NH₃, và độ kiềm được theo dõi và ghi nhận mỗi ngày 1 lần vào buổi sáng bằng máy đo pH, nhiệt kế, khúc xạ kế, và bộ test NO₂, NH₃, và KH.

PHẦN 4. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

4.1 Kết quả phân lập vi khuẩn *Vibrio harveyi*

Tổng số 30 mẫu tôm thẻ chân trắng có dấu hiệu bệnh lý bên ngoài của tôm thu từ ao nuôi: Tôm bệnh hoạt động chậm chạp, bỏ ăn, lơ đãng và tắt mé. Khi tách bỏ lớp vỏ đầu ngực, quan sát thấy ruột rỗng hoặc đứt khúc



Hình 4.1: Màu sắc gan tái nhợt



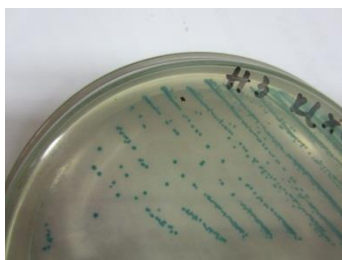
Hình 4.2: Tôm bị đường ruột rỗng

Sau khi phân lập trên môi trường Chrom agar Vibrio 20 mẫu tôm thẻ chân trắng có xuất hiện vi khuẩn vi khuẩn *Vibrio harveyi* chiếm tỉ lệ 100 %. Kết quả phân lập 20 mẫu tôm thẻ chân trắng trên môi trường Chrom agar Vibrio đều cho thấy khuẩn lạc màu xanh, hình tròn, lồi, kết quả tương tự như nghiên cứu của Lê Kiều Xuyên, 2014.

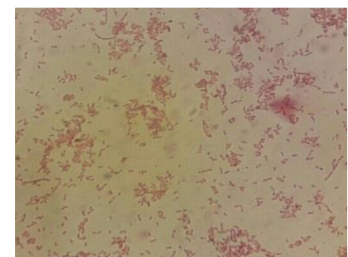
4.2 Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu hình thái, đặc tính sinh lý, sinh hóa của vi khuẩn *Vibrio harveyi*

4.2.1 Kết quả nhuộm Gram vi khuẩn

+



Hình 4.3 Vi khuẩn *Vibrio harveyi*



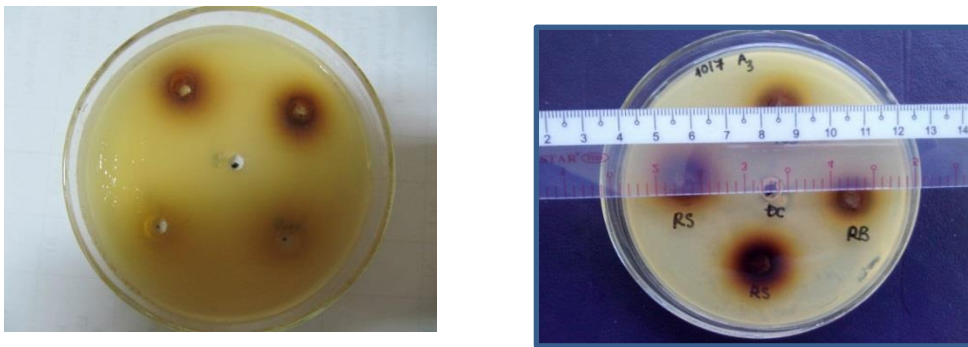
Hình 4.4 Nhuộm Gram vi khuẩn

Qua kết quả nhuộm Gram cho thấy vi khuẩn *Vibrio harveyi* phân lập có đặc điểm thuộc Gram âm, có hình que. Kết quả này cũng tương tự như nghiên cứu của Lê Kiều Xuyên, 2014 và Buler (2004), thì nhóm *Vibrio harveyi* cũng có chung đặc điểm thuộc Gram âm, có hình que thẳng hoặc hơi uốn cong và chuyển động. Vi khuẩn *Vibrio* phát triển trên môi trường thạch chọn lọc Chrom agar Vibrio. Các đặc điểm tương tự cũng được ghi nhận trong nghiên cứu định danh các chủng vi khuẩn phân lập được từ tôm bệnh hoại tử gan tụy

thu ở một số tỉnh thuộc khu vực ĐBSCL (Nguyễn Ngọc Thạch, 2013; Nguyễn Khắc Thoáng, 2013).

4.3 Kết quả xác định khả năng kháng khuẩn *Vibrio harveyi* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch

Kết quả xác định khả năng kháng khuẩn *Vibrio harveyi* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch của vi khuẩn phân lập được thì vi khuẩn có tính nhạy yếu với dịch chiết rong bún sau 3 lần lặp.



Hình 4.5: Kết quả xác định khả năng kháng khuẩn *Vibrio harveyi* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch

Qua kết quả nghiên cứu cho thấy vòng kháng khuẩn của rong bún dao động từ 8 – 12mm, so với kết quả nghiên cứu của Đặng Thị Lụa và cs (2015) về hoạt tính kháng vi khuẩn trên tôm của một số cây thuốc nam ở ĐBSCL thì khả năng tạo vòng kháng vô trùng của rong bún nhỏ hơn vòng kháng vô trùng của một số loại thảo dược của nghiên cứu này. Điển hình như dịch chiết lá trầu không và lá ổi với đường kính vòng vô khuẩn tương ứng dao động từ 15 - 17,3mm và 14,6 - 20mm.

Một nghiên cứu khác của Đặng Thị Lụa và *ctv* (2015) về hoạt tính kháng khuẩn của lá sim và hạt sim. Kết quả thử nghiệm cũng cho thấy, đường kính vòng vô khuẩn đạt được cao nhất của dịch chiết lá sim ở nồng độ 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ đối với 3 chủng vi khuẩn gây AHPND là 14mm. Trong khi đó, đường kính vòng vô khuẩn của dịch chiết hạt sim ở nồng độ 30 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ đạt từ 17,67mm -18,00mm. So với kết quả nghiên cứu của Đặng Thị Lụa và *ctv* (2015) thì khả năng tạo vòng kháng vô trùng của rong bún nhỏ hơn vòng kháng vô trùng của lá sim và hạt sim trong nghiên cứu này.

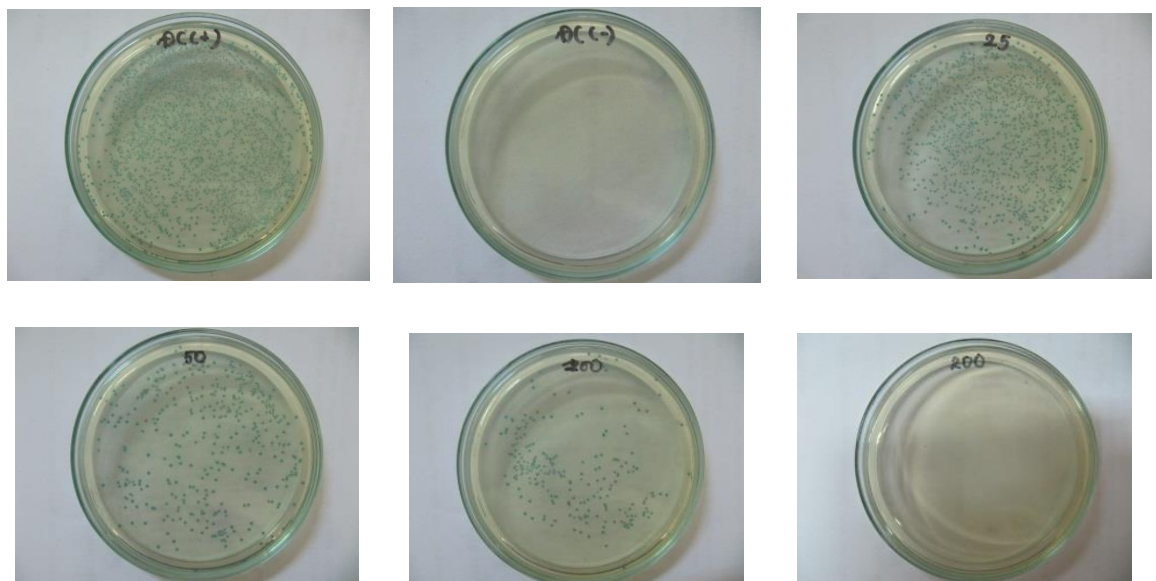
4.4 Xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) từ dịch chiết rong bún

Qua kết quả thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu của rong bún ở các nồng độ 25 mg/ml; 50mg/ml; 100mg/ml; 200mg/ml với mật độ vi khuẩn 10^6 tb/ml (hình 4.6), sau 24 giờ trải mẫu trên môi trường chrom agar vibrio, kết quả trải mẫu thể hiện ở hình 4.7.

Kết quả thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu của dịch chiết rong bún :



Hình 4.6: Kết quả thử nghiệm nồng độ ức chế tối thiểu của dịch chiết rong bún



Hình 4.7: Kết quả trải các nồng độ dịch chiết rong bún lên đĩa Chrom agar Vibrio

Kết quả trải vi khuẩn sau khi xác định nồng độ ức chế tối thiểu của rong bún ở hình 4.7 cho thấy ở nồng độ 100 mg/ml rong bún có khả năng ức chế vi khuẩn *Vibrio harveyi*. Tuy nhiên, ở nồng độ 200mg/ml rong bún có khả năng ức chế hoàn toàn vi khuẩn *Vibrio harveyi*. Do đó nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của dịch chiết rong bún là 200mg/ml đối với vi khuẩn ở mật độ 10^6 CFU/ml. Ở nồng độ thảo dược 25– 50mg/ml tuy vi khuẩn vẫn còn tồn tại nhưng mật số vi khuẩn giảm đi rõ rệt.

4.5 Kết quả xác định khả năng miễn dịch của tôm khi cho ăn thức ăn có bổ sung bột rong bún trong điều kiện *in vivo*

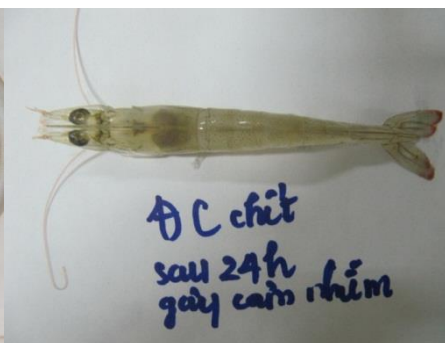
Sau khi cho tôm ăn bột rong bún 1 tuần tiến hành gây cảm nhiễm, kết quả ở nghiệm thức đối chứng tôm có dấu hiệu bệnh và chết rải rác sau 24 giờ gây cảm nhiễm, ở nghiệm thức rong bún 1 số lượng tôm chết nhiều hơn nghiệm thức rong bún 2, chứng tỏ khi cho tôm ăn rong bún với liều 400mg/ml thì khả năng miễn dịch của tôm cao hơn liều 200mg/ml

Bảng 4.1. Ghi nhận tôm chết sau khi gây cảm nhiễm

NGÀY	ĐC	RB1MIC	RB2MIC
12/12/2017	6 con	4 con	1 con
13/12/2017	7 con	3 con	0
14/12/2017	2 con	1 con	2 con
15/12/2017	2 con	2 con	1 con
16/12/2017	3 con	5 con	4 con
17/12/2017	2 con	1 con	1 con
Tổng	22 con	16 con	9 con



Hình 4.8 Tôm trước khi TN



Hình 4.9 Tôm ở NT ĐC có dấu hiệu bệnh

Sau khi gây cảm nhiễm theo dõi hoạt động của tôm, ghi nhận và thu mẫu tôm cấy trên môi trường chrom agar vibrio. Kết quả thể hiện ở bảng 4.2

Bảng 4.2. Kết quả trải mẫu:

	ĐC	RB1MIC	RB2MIC
Lần 1	1052 KL	384 KL	28 KL
Lần 2	1140 KL	310 KL	103 KL
Lần 3	1112 KL	433 KL	120 KL
Tổng	1101 KL	376KL	83KL

Thu tôm ở các nghiệm thức thí nghiệm đem cấy trên môi trường chrom agar vibrio. Kết quả thể hiện ở hình 4.2 cho thấy mật số vi khuẩn giảm dần khi tăng lượng rong bún, và ở nghiệm thức cho tôm ăn rong bún với liều lượng 2MIC tôm có khả năng miễn dịch tốt hơn liều rong bún 1 MIC, ở nghiệm thức đối chứng mật số vi khuẩn tôm tại trong tôm rất cao và tôm chết 90% sau khi kết thúc thí nghiệm.



Hình 4.10. số khuẩn lạc ở nghiệm thức đối chứng



Hình 4.11. số khuẩn lạc ở nghiệm thức rong bún

PHẦN V. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

5.1 Kết luận

Trong tổng số 20 mẫu tôm thẻ chân trắng sau khi phân lập trên môi trường Chrom agar. Kết quả phân lập được 20 chủng vi khuẩn *Vibrio harveyi*

Kết quả thử nghiệm xác định khả năng kháng khuẩn *Vibrio harveyi* bằng phương pháp khuếch tán giếng thạch thì rong bún có khả năng hình thành vòng kháng khuẩn trung bình 8-12mm

Dịch chiết rong bún có nồng độ ức chế tối thiểu lên chủng vi khuẩn *Vibrio harveyi* là 200 mg/ml.

Kết quả thí nghiệm cho tôm ăn bột rong bún ở nồng độ 200mg/ml tôm có khả năng miễn dịch đối với vi khuẩn *Vibrio harveyi*

5.2 Kiến nghị

Cần có nghiên cứu sâu và chi tiết hơn khả năng kháng khuẩn của rong bún trên thủy sản

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bùi Quang Tề, 2006. Bệnh học thủy sản, Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản 1. Ngày truy cập 1/7/2017.
2. Bùi Thị Ny.2012. Luận văn tốt nghiệp: “Đánh giá khả năng sử dụng rong bún (*Enteromorpha sp.*) tươi thay thế thức ăn viên nuôi cá nâu trong bể (*scatophagus argus*)”.
3. Châu Tài Tảo, 2013. Tổng quan nuôi Tôm Thẻ Chân Trắng trên thế giới và Việt Nam, Khoa Thủy Sản, Trường Đại học Cần Thơ. Ngày truy cập 25/6/2017.
4. Chu Thị Hằng, 2007. Rong Sụn và các sản phẩm chế biến từ Rong Sụn. Ngày truy cập 10/7/2017.
5. Đặng Thị Hoàng Oanh và Nguyễn Thanh Phương, 2012. Các bệnh nguy hiểm trên tôm nuôi ở Đồng bằng Sông Cửu Long. Tạp chí khoa học Trường Đại học Cần Thơ 22c: 106 – 118. Ngày truy cập 6/7/2017.
6. Đặng Thị Lua và ctv (2015). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn invitro của dịch chiết lá trà không (*piper betle l.*) và dịch chiết lá ổi (*psidium guajava*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm nuôi nước lợ. Ngày truy cập 24/7/2017.
7. Đặng Thị Lua, Lại Thị Ngọc Hà, Nguyễn Thanh Hải (2015). Nghiên cứu tác dụng diệt khuẩn của dịch chiết lá sim và hạt sim (*rhodomyrtus tomentosa*) đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm nuôi nước lợ. Ngày truy cập 24/7/2017.
8. Đinh Thị Kim Nhung, Trần Thành Công, Giang Thị Tuyết Trân và Nguyễn Thị Ngọc Anh. Nghiên cứu khả năng sử dụng rong bún (*Enteromorpha sp.*) và rong mền (*Cladophoraceae*) làm thức ăn cho tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) trong mô hình nuôi kết hợp. Ngày truy cập 28/6/2017.
9. Đỗ Thị Hồng Thắm, 2014. Luận văn tốt nghiệp: “Khảo sát hàm lượng fucoidan từ một số loài rong nâu phổ biến ở Khánh Hòa”. Ngày truy cập 14/8/2017.
10. Huỳnh Thị Tú, 2006. Khảo sát tình hình sử dụng thuốc - hóa chất trong nuôi tôm và sự tồn lưu của *Enrofloxacin* và *Furazolidone* trong tôm sú (*Penaeus monodon*). Ngày truy cập 22/7/2017.
11. Huỳnh Trường Giang và ctv (2013). Nghiên cứu xác định được thành phần hóa học, hoạt tính chống oxy hóa của hỗn hợp polysaccharide trích từ rong mơ *S.microcystum*. Ngày truy cập 8/7/2017.
12. Lê Anh Tuấn, 2014. Khóa luận tốt nghiệp :“Đánh giá khả năng đối kháng với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* phân lập từ mẫu tôm thẻ bệnh hoại tử gan tụy (AHPNS) của một số chủng *Bacillus*”. Ngày truy cập 20/7/2017.
13. Lê Hồng Phước, Lê Hữu Tài và Nguyễn Văn Hảo, 2012. 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 6/7/2017.

14. Lê Hữu Tài, Nguyễn Văn Hào và Lê Hồng Phước, 2012. Một số kết quả chẩn đoán mô bệnh học và phân tích siêu cấu trúc của hội chứng hoại tử gan tụy trên tôm nuôi ở Đồng bằng sông Cửu Long. Ngày truy cập 7/7/2017.
15. Lê Kiều Lam, 2011. Luận văn tốt nghiệp: “Khảo sát tình hình sử dụng thuốc và hóa chất trong nuôi tôm sú thâm canh ở Thành phố Bạc Liêu”. Ngày truy cập 15/7/2017.
16. Lý Văn Thoáng, 2015. Tiểu luận tốt nghiệp: “Tình hình sử dụng thuốc, hóa chất trong nuôi tôm thẻ chân trắng thâm canh ở huyện Phú Tân - tỉnh Cà Mau”. Ngày truy cập 15/7/2017.
17. Mai Văn Tài và ctv, 2003. Hiện trạng sử dụng và quản lý thuốc, hóa chất và chế phẩm sinh học trong nuôi tôm ở tỉnh Quảng Ninh. Tuyển tập báo cáo khoa học về NTTS tại hội nghị khoa học toàn quốc lần thứ 2, năm 2003. Nhà xuất bản Nông nghiệp. Ngày truy cập 22/7/2017.
18. Ngô Trọng Lư, Thái Bá Hồ. Kỹ thuật nuôi thủy đặc sản nước ngọt. NXB Nông Nghiệp, 2005. Ngày truy cập 26/6/2017.
19. Nguyễn Duy Nhứt, Bùi Minh Lý, Thành Thị Thu Thủy, Nguyễn Mạnh Cường, Trần Văn Sung, 2008. Nghiên cứu fucoidan có hoạt tính gây độc tế bào tách từ rong nâu *Sargasum swartzii* bằng phương pháp phổ khối nhiều lần. Tạp chí hóa học, T.47(3), tr.300-307. Ngày truy cập 3/7/2017.
20. Nguyễn Khắc Thoáng, 2013. Định danh và xác định tính nhạy của thuốc kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ tôm bệnh hoại tử gan tụy ở Sóc Trăng và Trà Vinh. Luận văn tốt nghiệp đại học. Ngày truy cập 5/7/2017.
21. Nguyễn Ngọc Thạch, 2013. Phân lập và xác định tính nhạy đối với thuốc kháng sinh của vi khuẩn *Vibrio* phân lập từ tôm bệnh hoại tử gan tụy ở Cà Mau. Luận văn tốt nghiệp đại học. Ngày truy cập 5/7/2017.
22. Nguyễn Thế Vương, 2009. Khóa luận văn tốt nghiệp: “Xác định tác nhân gây bệnh và nghiên cứu một số loại thảo dược trong phòng trị bệnh vi khuẩn trên tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*), trường Đại học Nông Lâm Huế”.
23. Nguyễn Thị Cẩm Ly, 2010. Luận văn tốt nghiệp: “Phân lập và xác định gen độc tố của vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trong hải sản tươi sống tại các chợ ở thành phố Nha Trang”. Ngày truy cập 30/6/2017.
24. Nguyễn Thị Ngọc Anh, 2014. Nghiên cứu khả năng sử dụng rong bún làm thức ăn thay thế một phần thức ăn viên trong nuôi cá rô phi. Ngày truy cập 8/7/2017.
25. Nguyễn Thị Phương Nga (2004). Phân tích tình hình phân phối và sử dụng thuốc trong nuôi thủy sản tại Sóc Trăng, Bạc Liêu, Cà Mau. Luận văn thạc sĩ, chuyên ngành nuôi trồng Thủy sản, Đại học Cần Thơ. Ngày truy cập 22/7/2017.
26. Nguyễn Thị Tý Nị. 2012. Đánh giá khả năng sử dụng rong bún (*Enteromorpha sp.*) làm thức ăn cho cá nâu (*Scatophagus argus*). Luận văn cao học, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ, 68 trang. Ngày truy cập 28/6/2017.