

BAN BIÊN TẬP TẠP CHÍ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN

STT	Họ tên	Đơn vị	Nhiệm vụ
I	Thành viên trong nước		
1	Nguyễn Hay	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Tổng biên tập
2	Chế Minh Tùng	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Phó tổng biên tập
3	Nguyễn Đình Phú	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM University of California, Irvine, Mỹ	Biên tập viên
4	Lê Đình Đôn	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
5	Lê Quốc Tuấn	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
6	Nguyễn Bạch Đằng	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
7	Nguyễn Huy Bích	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
8	Phan Tại Huân	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
9	Nguyễn Phú Hòa	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
10	Võ Thị Trà An	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
11	Tăng Thị Kim Hồng	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Biên tập viên
II	Thành viên nước ngoài		
12	Tô Phúc Tường	Nguyên chuyên gia IRRI, Việt Nam	Biên tập viên
13	Peeyush Soni	Asian Institute of Technology, Thái Lan	Biên tập viên
14	Ta-Te Lin	National Taiwan University, Đài Loan	Biên tập viên
15	Glenn M. Young	University of California, Davis, Mỹ	Biên tập viên
16	Soroosh Sorooshian	University of California, Irvine, Mỹ	Biên tập viên
17	Katleen Raes	Ghent University, Bỉ	Biên tập viên
18	Vanessa Louzier	Lyon University, Pháp	Biên tập viên
19	Wayne L. Bryden	The University of Queensland, Úc	Biên tập viên
20	Jitender Singh	Sardar Vallabhbhai Patel University of Agriculture and Technology, Ấn Độ	Biên tập viên
21	Kevin Fitzsimmons	University of Arizona, Mỹ	Biên tập viên
22	Cyril Marchand	University of New-Caledonia, Pháp	Biên tập viên
23	Koichiro Shiomori	University of Miyazaki, Nhật Bản	Biên tập viên
24	Kazunari Tsuji	Saga University, Nhật Bản	Biên tập viên
25	Sreeramanan Subramaniam	Universiti Sains Malaysia, Malaysia	Biên tập viên
26	Thomas L. Rost	University of California, Davis, Mỹ	Biên tập viên
27	James E. Hill	University of California, Davis, Mỹ	Biên tập viên

BAN THƯ KÝ TẠP CHÍ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN

STT	Họ tên	Đơn vị	Nhiệm vụ
1	Huỳnh Tiến Đạt	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Trưởng ban thư ký
2	Trương Quang Bình	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Trưởng ban trị sự
3	Phạm Hồng Anh	Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM	Thành viên

Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển

Giấy phép xuất bản:
567/GP-BVHTT-24/12/2002
175/GP-BTTTT-20/04/2018

Tòa soạn:

Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM
Khu phố 6, Phường Linh Trung, TP. Thủ Đức, TP.HCM
Điện thoại: (028)37245670
Email: jad@hcmuaf.edu.vn

MỤC LỤC (CONTENT)

- Nông học, Lâm nghiệp (Agronomy and Forestry Sciences)**
- 1 Selection of sugarcane varieties (*Saccharum officianum* L.) with high yield and quality, suitable for cultivation conditions in Binh Duong province
Tuan V. Tran, & Hien V. Pham
- Tuyển chọn giống mía (*Saccharum officianum* L.) có năng suất và chất lượng cao, phù hợp với điều kiện canh tác tỉnh Bình Dương
Trần Văn Tuấn & Phạm Văn Hiền
- Chăn nuôi, Thú y, Thủy sản (Animal Sciences, Veterinary Medicine and Aquaculture)**
- 8 Effects of low-density lipoprotein extracted from egg yolk on preservation of chilled canine semen (4°C)
Van T. Nguyen, Anh T. P. Nguyen, Huy D. Nguyen, Phuc L. G. Ha, & Khanh T. V. Doan
- Ảnh hưởng của lipoprotein tỷ trọng thấp chiết xuất từ lòng đỏ trứng gà trong bảo quản lạnh (4°C) tinh dịch chó
Nguyễn Tử Văn, Nguyễn Thị Phương Anh, Nguyễn Đức Huy, Hà Lê Gia Phúc & Đoàn Trần Vĩnh Khánh
- 16 Detection methods of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and its mutant (mutant-AHPND) in shrimp
Dung H. T. Mai, Binh T. Huynh, Hoan P. K. Nguyen, & Hieu V. Tran
- Các phương pháp phát hiện bệnh Hoại tử gan tụy cấp (AHPND) và dạng đột biến (mutant-AHPND) trên tôm
Mai Hoàng Thùy Dung, Huỳnh Tuấn Bình, Nguyễn Phước Khải Hoàn & Trần Văn Hiếu
- 28 Assessment of the immune responses of macrophages in selective breeding pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*) resistant to enteric septicemia of catfish (ESC)
Dung T. P. Tran, Sang V. Nguyen, Phuong H. Vo, Phuc H. Tran, Quan T. T. Huynh, & Thinh H. Nguyen
- Đánh giá đáp ứng miễn dịch của đại thực bào trong các gia đình cá tra chọn giống (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mủ
Trần Thị Phương Dung, Nguyễn Văn Sáng, Võ Hồng Phương, Trần Hữu Phúc, Huỳnh Thị Trúc Quân & Nguyễn Hữu Thịnh
- 39 Trial on artificial breeding and laviculture of giant razor clams (*Cultellus maximus* Gmelin, 1791)
Hong T. Nguyen, & Nhan T. Dinh
- Thử nghiệm sinh sản nhân tạo và ương giống ngao móng tay chúa (*Cultellus maximus* Gmelin, 1791)
Nguyễn Thanh Hồng & Đinh Thế Nhân

- 47 Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from the white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) collected from Binh Dien Agricultural Wholesale Market
Hue N. D. Truyen, Thanh N. Khuu, Nhu T. B. Do, & Thu N. T. Tran

Sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) thương mại tại chợ đầu mối nông sản Bình Điền
Truyện Nhã Định Huệ, Khuu Nhật Thành, Đỗ Thị Bảo Như & Trần Nguyễn Thanh Thư

Công nghệ sinh học (Biotechnology)

- 53 Isolation and selection of carotenoid-producing bacteria from marine environment and determination of carotenoid extraction condition
Cuc T. H. Le, Hoa T. M. Le, Trang T. Tran, Vi T. T. Van, Phong V. Nguyen, & Thanh T. L. Bien

Phân lập, tuyển chọn các dòng vi khuẩn sinh carotenoid từ môi trường biển và xác định điều kiện ly trích sắc tố
Lê Thị Hoàng Cúc, Lê Thị Mỹ Hoa, Trần Thuỳ Trang, Văn Thị Tường Vi, Nguyễn Vũ Phong & Biện Thị Lan Thanh

Môi Trường và Tài Nguyên (Environmental and Natural Resources)

- 62 Survey of lighting systems and aesthetic illumination design for various major parks in Ho Chi Minh City
Thuy T. Vuong, Tien T. M. Duong, Nguyen N. M. Vo, Nghia T. Dang, Khanh T. Nguyen, & Truong X. Ha

Khảo sát hiện trạng hệ thống chiếu sáng và thiết kế ánh sáng nghệ thuật cho năm công viên trọng điểm tại Thành phố Hồ Chí Minh
Vương Thị Thủy, Dương Thị Mỹ Tiên, Võ Nguyễn Minh Nguyên, Đặng Thành Nghĩa, Nguyễn Tuấn Khanh & Hà Xuân Trường

Selection of sugarcane varieties (*Saccharum officianum* L.) with high yield and quality, suitable for cultivation conditions in Binh Duong province

Tuan V. Tran^{1*}, & Hien V. Pham²

¹Department of Agronomy, Sugar Research Institute, Binh Duong, Vietnam

²Faculty of Agronomy, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: August 25, 2021

Revised: October 01, 2021

Accepted: October 22, 2021

Keywords

Commercial cane sugar (CCS)

Drought

Irrigation

Rain-fed

Sugarcane varieties

*Corresponding author

Tran Van Tuan

Email: tuanct57@gmail.com

ABSTRACT

The objective of this research was to select sugarcane varieties with yield > 60 tons/ha and commercial cane sugar (CCS) > 11, to recommend to put into production in Binh Duong province. This study was carried out in Phu An commune - Ben Cat town - Binh Duong province, from January 2020 to December 2020. The experiment was designed in a split plot (SPD) with 3 replications and 2 factors, including irrigation as main-plot factor with 2 levels as irrigated and rain-fed (non-irrigation) conditions, and sugarcane varieties as subplot factor with 10 VN varieties named VN14-13-4, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-37-2, VN14-41-8, VN14-45-3, VN14-49-6, VN14-74-1, VN14-87-11 and VN14-89-3. The controls consisted of drought tolerance VN84-4137 and drought sensitive KU60-1 varieties. The results showed that VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13, and VN14-87-11 were promising sugarcane varieties, suitable for cultivation conditions in Binh Duong province. Cane yield of these varieties ranged from 69.67 tons/ha to 75.50 tons/ha in irrigated condition. In the rain-fed condition the yields obtained were from 55.50 tons/ha to 61.17 tons/ha. Their average yield was above 62 tons/ha and equivalent to control VN84-4137. Sugar contents of these varieties were above 11.90 CCS. The corrected yield for 10 CCS ranged from 86.83 to 94.78 tons/ha in irrigated condition and 66.10 to 73.99 tons/ha in rain-fed condition.

Cited as: Tran, T. V., & Pham, H. V. (2021). Selection of sugarcane varieties (*Saccharum officianum* L.) with high yield and quality, suitable for cultivation conditions in Binh Duong province. *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 1-7.

Tuyển chọn giống mía (*Saccharum officinarum* L.) có năng suất và chất lượng cao, phù hợp với điều kiện canh tác tỉnh Bình Dương

Trần Văn Tuấn¹ & Phạm Văn Hiền²

¹Bộ Môn Nông Học, Viện Nghiên Cứu Mía Đường, Bình Dương

²Khoa Nông Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 25/08/2021

Ngày chỉnh sửa: 01/10/2021

Ngày chấp nhận: 22/10/2021

Từ khóa

Chữ đường

Giống mía

Khô hạn

Nhờ nước trời

Tưới nước

*Tác giả liên hệ

Trần Văn Tuấn

Email: tuanct57@gmail.com

TÓM TẮT

Đề tài nhằm chọn ra được giống mía đạt năng suất > 60 tấn/ha, chữ đường (CCS) > 11, để khuyến cáo đưa vào sản xuất tại tỉnh Bình Dương. Nghiên cứu được thực hiện tại xã Phú An, thị xã Bến Cát, tỉnh Bình Dương, từ tháng 01/2020 đến tháng 12/2020. Thí nghiệm bố trí theo kiểu lô phụ (SPD) với 3 lần lặp và 2 yếu tố, lô chính với 2 mức độ là điều kiện có tưới và nhờ nước trời (không tưới), giống mía bố trí lô phụ với 10 giống là VN14-13-4, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-37-2, VN14-41-8, VN14-45-3, VN14-49-6, VN14-74-1, VN14-87-11, VN14-89-3 và đối chứng: giống VN84-4137 chống chịu khô hạn và giống KU60-1 miễn cảm khô hạn. Kết quả ghi nhận: VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-87-11 là 4 giống mía có triển vọng, phù hợp với điều kiện canh tác tỉnh Bình Dương. Năng suất thực thu của các giống mía này từ 69,67 đến 75,50 tấn/ha trong điều kiện có tưới và từ 55,50 đến 61,17 tấn/ha trong điều kiện nhờ nước trời, năng suất thực thu bình quân trên 62 tấn/ha, tương đương so với giống đối chứng VN84-4137. Chữ đường của các giống này trên 11,90 CCS, năng suất mía quy 10 CCS từ 86,83 đến 94,78 tấn/ha trong điều kiện có tưới và từ 66,10 đến 73,99 tấn/ha trong điều kiện nhờ nước trời, năng suất mía quy 10 CCS bình quân của chúng trên 76 tấn/ha, tương đương so với giống đối chứng VN84-4137.

1. Đặt Vấn Đề

Tỉnh Bình Dương thuộc miền Đông Nam bộ, có khí hậu nhiệt đới gió mùa, đặc trưng chủ yếu như nhiệt độ cao, khí hậu nóng ẩm, cường độ ánh sáng mạnh, lượng mưa nhiều và tập trung một số tháng trong năm (từ tháng 5 đến tháng 11), tương đối thích hợp cho cây mía sinh trưởng, phát triển, đạt năng suất chất lượng cao, nhất là khi được tưới bổ sung trong mùa khô (Cao, 2020).

Vụ mía 2019/2020, tỉnh Bình Dương có tổng diện tích mía 561 ha, năng suất bình quân 42,0 tấn/ha thấp hơn năng suất bình quân chung của cả nước (64,7 tấn/ha). Cơ cấu giống mía dù đã được cải thiện nhưng các giống mía chủ lực K95-156 và LK92-11 (chiếm khoảng 76% diện tích mía) hiện đang bị nhiễm bệnh nhiều, là một trong những yếu tố làm giảm năng suất, chất lượng mía (Cao, 2020). Để đảm bảo cho cây mía sinh trưởng, phát triển tốt thì trong mỗi giai đoạn sinh trưởng

phải đảm bảo một độ ẩm nhất định, tùy thời tiết, giống, kỹ thuật canh tác mà nhu cầu nước có thể biến động từ 13.000 - 20.000 tấn nước/ha để cho 100 tấn mía; khi cây mía thiếu nước sẽ chậm phát triển và năng suất mía bị giảm từ 15 - 40% (Tran, 2003). Công tác nghiên cứu giống mía đã lai tạo và nhập nội được một số giống mía có khả năng chịu hạn và được đưa vào sản xuất như VN84-4137, VN85-1427 và K88-92... có năng suất trung bình trên 70 tấn/ha nhưng đang bị sâu bệnh hại nhiều. Đặc biệt những năm gần đây, giá đường trên thế giới và trong nước có chiều hướng giảm, dẫn đến giá mía ngày càng giảm, kết hợp với thời tiết hạn hán thường xuyên dẫn tới hiệu quả kinh tế cây mía thấp (Cao, 2020). Để khắc phục những tồn tại trên, việc tuyển chọn các giống mía có năng suất cao, chất lượng tốt để đa dạng hóa bộ giống hiện đang được trồng phổ biến trong sản xuất, phù hợp với điều kiện canh tác tỉnh Bình Dương là hết sức cấp thiết.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Gồm 10 giống mía có xuất xứ từ Việt Nam, bao gồm VN14-13-4, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-37-2, VN14-41-8, VN14-45-3, VN14-49-6, VN14-74-1, VN14-87-11, VN14-89-3 và 2 giống đối chứng là VN84-4137 chống chịu khô hạn xuất xứ từ Việt Nam, KU60-1 mẫn cảm khô hạn xuất xứ từ Thái Lan.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thực hiện: Áp dụng QCVN 01-131:2013 BNNPTNT – Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống mía.

Bố trí thí nghiệm: Thí nghiệm được bố trí theo kiểu lô phụ (SPD) với 3 lần và 2 yếu tố như sau:

- Lô chính bố trí tưới nước (T), bao gồm tưới nước (T1) và không tưới nước (T0).
- Lô phụ bố trí các giống (G) được sắp xếp ngẫu nhiên.

Chỉ tiêu theo dõi: Tỷ lệ mọc mầm, sức đẻ nhánh, chiều cao cây nguyên liệu, tốc độ vươn cao, khả năng chống chịu, các yếu tố cấu thành năng suất, chất lượng, năng suất quy 10 CCS.

2.3. Địa điểm và thời gian nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Viện Nghiên cứu Mía đường, xã Phú An, thị xã Bến Cát, tỉnh Bình Dương, từ tháng 01 năm 2020 và kết thúc vào tháng 12 năm 2020.

2.4. Phương pháp xử lý số liệu

Số liệu thí nghiệm được thu nhập, phân tích và xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel. Phân tích ANOVA và trắc nghiệm phân hạng bằng phần mềm SAS 9.1.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Tỷ lệ mọc mầm và sức đẻ nhánh của các giống mía

Thời kỳ mọc mầm là thời kỳ mở đầu quan trọng, có ảnh hưởng lớn đến quá trình sinh trưởng, phát triển của cây mía. Giai đoạn mọc

mầm quyết định mật độ cây và mật độ cây hữu hiệu khi thu hoạch. Tỷ lệ mọc mầm của các giống mía phụ thuộc chủ yếu vào chất lượng hom vì vậy tỷ lệ mọc mầm của các giống trong điều kiện có tưới và nhờ nước trời đều không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê so với 2 giống đối chứng VN84-4137 (42,00%), KU60-1 (42,30%). Theo quy chuẩn QCVN 01-131:2013/BNNPTNT, giống VN14-89-3 có tỷ lệ mọc mầm trung bình kém (39,52%), các giống còn lại ở mức trung bình (40,37 - 43,67%) nhưng về phương diện thống kê, các giống mới đều có tỷ lệ mọc mầm tương đương so với 2 giống đối chứng (Bảng 1).

Theo Tran (2003), mía là cây cần rất nhiều nước trong quá trình sinh trưởng và phát triển, mức tiêu thụ nước trên một ha vào khoảng 1.500 - 2.200 mm (50 - 60% lượng mưa hiệu quả). Kết quả nghiên cứu cho thấy khi thực hiện tưới bổ sung từ khi trồng mía có sự khác biệt về chỉ tiêu sức đẻ nhánh, trong điều kiện có tưới, sức đẻ nhánh của các giống (0,79 nhánh/cây mẹ) cao hơn so với trong điều kiện nhờ nước trời (0,56 nhánh/cây mẹ), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 99%. Các giống mía có sức đẻ nhánh dao động từ 0,45 đến 0,90 nhánh/cây mẹ, sai khác giữa các giống rất có ý nghĩa thống kê ở mức mức độ tin cậy 99%, trong đó VN14-37-2 có sức đẻ nhánh (0,90 nhánh/cây mẹ) cao hơn cả 2 giống chứng VN84-4137 (0,75 nhánh/cây mẹ) và KU60-1 (0,59 nhánh/cây mẹ); VN14-23-13, VN14-87-11, VN14-89-3, VN14-22-5 tương đương với đối chứng VN84-4137 và cao hơn so với đối chứng KU60-1.

3.2. Chiều cao cây nguyên liệu và tốc độ vươn cao của các giống mía

Trong điều kiện có tưới được bổ sung nước trong giai đoạn khô hạn, mía làm lóng vươn cao sớm, chiều cao cây nguyên liệu cao hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 99% so với trong điều kiện không tưới (233,4 so với 194,1 cm). Các giống VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-87-11, VN14-74-1 có chiều cao cây nguyên liệu tương đương so với giống đối chứng VN84-4137 (236,1 cm) và khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 99% so với giống đối chứng KU60-1 (189,4 cm) (Bảng 2). Kết quả này tương tự so với kết quả nghiên cứu của Le (2005) tại Bình Dương chiều cao cây nguyên liệu trong điều kiện thâm canh dao động từ 235,1 - 259,0 cm.

Đối với tốc độ vươn cao, không có sai khác giữa

Bảng 1. Tỷ lệ mọc mầm và sức đẻ nhánh của các giống mía

Giống	Tỷ lệ mọc mầm (%)			Sức đẻ nhánh (nhánh/cây mẹ)		
	Tươi	Không tươi	TB (B)	Tươi	Không tươi	TB (B)
VN84-4137 (đ/c)	41,48	42,52	42,00	0,87 ^{abc}	0,64 ^{e^{fg}}	0,75 ^b
VN14-37-2	41,63	40,59	41,11	0,96 ^a	0,85 ^{a-d}	0,90 ^a
VN14-89-3	39,19	39,85	39,52	0,94 ^{ab}	0,54 ^{fgh}	0,74 ^b
VN14-13-4	42,15	38,59	40,37	0,71 ^{c-f}	0,52 ^{gh}	0,61 ^c
VN14-49-6	45,78	40,67	43,22	0,53 ^{gh}	0,36 ^h	0,45 ^d
VN14-22-5	43,04	44,30	43,67	0,88 ^{abc}	0,65 ^{d-g}	0,77 ^b
VN14-23-13	43,85	40,15	42,00	0,81 ^{a-e}	0,79 ^{a-e}	0,80 ^{ab}
VN14-87-11	43,63	39,26	41,44	0,83 ^{a-e}	0,86 ^{a-d}	0,84 ^{ab}
VN14-74-1	41,41	41,93	41,67	0,80 ^{a-e}	0,41 ^h	0,61 ^c
VN14-45-3	42,74	43,33	43,04	0,76 ^{a-e}	0,38 ^h	0,57 ^{cd}
VN14-41-8	43,63	43,56	43,59	0,72 ^{c-f}	0,36 ^h	0,54 ^{cd}
KU60-1 (đ/c)	42,44	42,15	42,30	0,74 ^{b-e}	0,43 ^h	0,59 ^c
TB (A)	42,58	41,40		0,79 ^a	0,56 ^b	
	CV% = 9,46; F _A = 83,52 ^{ns} ;			CV% = 16,00; F _A = 356,16 ^{**} ;		
	F _B = 0,62 ^{ns} ; F _{AB} = 0,52 ^{ns} ;			F _B = 9,8 ^{**} ; F _{AB} = 2,67 ^{**}		

^{a-h} Các trung bình trong cùng một cột có các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$). Các ký tự in hoa khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê các giá trị trung bình giữa các giống/điều kiện tươi; Các ký tự in thường khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê giữa các nghiệm thức; ^{ns}: Khác biệt không có ý nghĩa; ^{**}: Khác biệt rất có ý nghĩa mức 0,01.

điều kiện có tươi và không tươi; giữa các giống có khoảng dao động từ 14,0 đến 20,7 cm/tháng, trong đó, VN14-37-2 cao có tốc độ vươn cao trên 20 cm/tháng, tương tự giống đối chứng VN84-4137 (Bảng 2).

3.3. Các yếu tố cấu thành năng suất của các giống mía

Mật độ cây hữu hiệu là một trong hai yếu tố quan trọng cấu thành năng suất (cùng với khối lượng cây). Đối với mật độ cây hữu hiệu, các giống VN14-37-2, VN14-22-5 và VN14-23-13 có ưu thế về mật độ cây hữu hiệu, tương đương so với giống đối chứng VN84-4137 (56,1 ngàn cây/ha) và cao hơn so với giống đối chứng KU60-1 (50,5 ngàn cây/ha). Mật độ cây hữu hiệu trung bình của các giống mía trong điều kiện có tươi (56,1 ngàn cây/ha) cao hơn trong điều kiện có tươi (48,9 ngàn cây/ha), khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 95% (Bảng 3).

Cùng với mật độ cây hữu hiệu, khối lượng cây là yếu tố quan trọng quyết định năng suất mía. Khối lượng cây của các giống dao động trong khoảng 1,22 - 1,41 kg, cao nhất là giống VN14-37-2 (1,41 kg), tương đương so với giống đối chứng VN84-4137 (1,37 kg) và cao hơn so với giống đối chứng KU60-1 (1,27 kg). Về khối lượng cây trung bình của các giống mía trong điều kiện có tươi (1,43 kg) khác biệt rất có ý nghĩa ở mức ý nghĩa

99% so với khối lượng cây trung bình của các giống mía trong điều kiện có tươi (1,43 kg) (Bảng 3).

3.4. Năng suất và chữ đường của các giống mía

Đánh giá ảnh hưởng của chế độ tưới lên năng suất cây mía trong điều kiện khô hạn, trong điều kiện có tưới cho thấy các giống VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13 có năng suất thực thu trên 70 tấn/ha, tương đương so với giống đối chứng VN84-4137 (74,0 tấn/ha) và cao hơn hoặc tương đương so với giống đối chứng KU60-1 (67,6 tấn/ha). Trong điều kiện không có tưới các giống VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-87-11 cho năng suất thực thu trên 55 tấn/ha tương đương so với giống đối chứng VN84-4137 (58,2 tấn/ha) và cao hơn so với giống đối chứng KU60-1 (43,8 tấn/ha). Các giống VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-87-11 đem lại năng suất thực thu bình quân ở 2 điều kiện có tưới và không tưới trên 62 tấn/ha, tương đương so với giống đối chứng VN84-4137 (66,1 tấn/ha) và cao hơn so với giống đối chứng KU60-1 (55,7 tấn/ha). Năng suất thực thu trung bình ở điều kiện có tưới (69,1 tấn/ha) cao hơn khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức ý nghĩa 99% so với ở điều kiện không tưới (48,0 tấn/ha) (Bảng 4).

Phân tích kết quả chữ đường cho thấy chữ đường của các giống đều đạt trên 10,5 CCS, nhìn

Bảng 2. Chiều cao cây nguyên liệu và tốc độ vươn cao của các giống mía

Giống	Chiều cao cây nguyên liệu (cm)			Tốc độ vươn cao (cm/tháng)		
	Tươi	Không tươi	TB (B)	Tươi	Không tươi	TB (B)
VN84-4137 (đ/c)	251,6	220,6	236,1 ^a	20,0	21,3	20,7
VN14-37-2	253,4	219,5	236,4 ^a	19,7	20,8	20,2
VN14-89-3	228,8	182,8	205,8 ^{cde}	17,3	16,4	16,8
VN14-13-4	217,0	170,5	193,8 ^e	15,2	14,6	14,9
VN14-49-6	220,1	177,2	198,7 ^{de}	15,8	15,7	15,8
VN14-22-5	248,7	213,2	230,9 ^{ab}	19,4	20,0	19,7
VN14-23-13	244,9	207,7	226,3 ^{abc}	18,7	19,2	18,9
VN14-87-11	244,5	213,0	228,8 ^{ab}	18,4	19,8	19,1
VN14-74-1	235,9	195,6	215,7 ^{a-d}	18,2	18,8	18,5
VN14-45-3	209,1	169,1	189,1 ^e	13,8	14,5	14,2
VN14-41-8	236,6	192,4	214,6 ^{bcd}	18,1	18,3	18,2
KU60-1 (đ/c)	210,7	168,1	189,4 ^e	14,0	14,0	14,0
TB (A)	233,4 ^a	194,1 ^b				
CV% = 7,66; F _A = 465,83 ^{**} ; F _B = 7,30 ^{**} ; F _{AB} = 0,17 ^{ns}						

^{a-e}Các trung bình trong cùng một cột có các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$). Các ký tự in hoa khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê các giá trị trung bình giữa các giống/điều kiện tươi; Các ký tự in thường khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê giữa các nghiệm thức; ^{ns}: Khác biệt không có ý nghĩa; ^{**}: Khác biệt rất có ý nghĩa mức 0,01.

Bảng 3. Các yếu tố cấu thành năng suất của các giống mía

Giống	Mật độ cây hữu hiệu (ngàn cây/ha)			Khối lượng cây (kg)		
	Tươi	Không tươi	TB (B)	Tươi	Không tươi	TB (B)
VN84-4137(đ/c)	57,6	54,6	56,1 ^{ab}	1,48	1,25	1,37 ^{ab}
VN14-37-2	61,5	57,0	59,2 ^a	1,52	1,29	1,41 ^a
VN14-89-3	55,1	47,0	51,0 ^{bc}	1,43	1,10	1,26 ^{cde}
VN14-13-4	54,3	45,6	50,0 ^c	1,41	1,08	1,24 ^{de}
VN14-49-6	53,4	42,4	47,9 ^c	1,39	1,09	1,24 ^{de}
VN14-22-5	61,2	57,5	59,3 ^a	1,46	1,24	1,35 ^{abc}
VN14-23-13	59,2	56,1	57,6 ^a	1,44	1,22	1,33 ^{a-d}
VN14-87-11	58,2	53,3	55,7 ^{ab}	1,43	1,23	1,33 ^{a-d}
VN14-74-1	53,6	42,8	48,2 ^c	1,42	1,15	1,28 ^{b-e}
VN14-45-3	52,7	43,0	47,8 ^c	1,37	1,08	1,22 ^e
VN14-41-8	51,2	41,2	46,2 ^c	1,38	1,11	1,24 ^{de}
KU60-1 (đ/c)	54,7	46,2	50,5 ^{bc}	1,43	1,12	1,27 ^{b-e}
TB (A)	56,1 ^a	48,9 ^b		1,43 ^a	1,16 ^b	
CV% = 9,29; F _A = 24,83 [*] ; F _B = 5,86 ^{**} ; F _{AB} = 0,61 ^{ns} ; CV% = 5,46; F _A = 2.309,77 ^{**} ; F _B = 4,13 ^{**} ; F _{AB} = 0,60 ^{ns}						

^{a-e}Các trung bình trong cùng một cột có các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$). Các ký tự in hoa khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê các giá trị trung bình giữa các giống/điều kiện tươi; Các ký tự in thường khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thống kê giữa các nghiệm thức; ^{ns}: Khác biệt không có ý nghĩa; ^{*}: Khác biệt có ý nghĩa mức 0,05; ^{**}: Khác biệt rất có ý nghĩa mức 0,01.

chung có phần thấp hơn so với đối chứng VN84-417 (12,70 - 12,80 CCS) và cao hơn so với giống đối chứng KU60-1 (10,10 - 10,31 CCS), trong đó VN14-37-2, VN14-89-3, VN14-22-5 và VN14-23-13 có chữ đường trên 12 CCS trong cả 2 điều kiện có tươi và không tươi. Chữ đường trong điều kiện có tươi đạt 12,15 CCS, cao hơn 0,43 CCS so với

điều kiện không tươi.

Luc & ctv. (2020) cho kết quả nghiên cứu bộ giống tương tự tại tỉnh Nghệ An cho thấy phần trăm vượt của năng suất quy 10 CCS ở điều kiện có tươi so với ở điều kiện không tươi là 33,1%, cao hơn phần trăm vượt của các giống VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-87-11 và thấp

hơn phần trăm vượt của các giống còn lại trong thí nghiệm. Năng suất quy 10 CCS trung bình ở 2 điều kiện có tưới và không tưới của các giống VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-87-11 trên 76 tấn/ha, kém hơn dưới 10% so với giống đối chứng VN84-4137 (giống chịu hạn, có năng suất và chữ đường cao nhất trong số 2 giống đối chứng); các giống còn lại kém hơn đối chứng VN84-4137 trong khoảng 19,0 - 27,7%. Như vậy, các giống VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13, VN14-87-11 cho năng suất cao ít bị ảnh hưởng bởi điều kiện tưới hơn so với các giống còn lại.

3.5. Khả năng chống chịu sâu bệnh hại của các giống mía

Cao (2015) ghi nhận rằng, tỷ lệ cây bị hại dưới 10% là ngưỡng gây hại chấp nhận được trong sản xuất và chưa vượt ngưỡng gây hại về kinh tế. Trong quá trình sinh trưởng của các giống mía, bị hại chủ yếu bởi sâu đục thân 4 vạch đầu vàng (*Chilo sacchariphagus* Bojer) và sâu đục thân mình tím (*Phragmataecia castaneae* Hubner). Nhìn chung, tất cả các giống mía đều có khả năng chống chịu sâu hại.

Chưa ghi nhận xuất hiện bệnh than (*Ustilago scitaminea* Sydow.), bệnh thối đỏ, bệnh xoắn cổ lá (*Gibberella moniliformis*) và bệnh trắng lá (*Mycoplasma*). Trong giai đoạn trước thu hoạch, bệnh đốm lá xuất hiện trên tất cả các giống tham gia khảo nghiệm nhưng chủ yếu gây hại trên các lá già không ảnh hưởng đến sinh trưởng của mía.

4. Kết Luận

Các giống mía VN14-37-2, VN14-22-5, VN14-23-13 và VN14-87-11 triển vọng cho năng suất, chất lượng tốt (năng suất thực thu > 60 tấn/ha, chữ đường > 11,9 CCS) phù hợp với cả điều kiện canh tác có tưới và nhờ nước trời tại tỉnh Bình Dương và có thể bổ sung bộ giống đang được trồng phổ biến hiện nay.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Bảng 4. Năng suất và chữ đường của các giống

Giống	Năng suất thực thu (tấn/ha)		Chữ đường (CCS)		Năng suất quy 10 CCS (tấn/ha)		
	Tưới	Không tưới	Tưới	Không tưới	Tưới	Không tưới	
VN84-4137 (đ/c)	74,0 ^{ab}	58,2 ^g	12,8	12,7	94,7	73,9	-
VN14-37-2	75,5 ^a	61,1 ^{fg}	12,3	12,0	93,5	73,3	-1,1
VN14-89-3	68,7 ^{b-e}	43,2 ^h	12,2	12,1	84,2	52,3	-19,0
VN14-13-4	67,1 ^{c-f}	41,5 ^h	11,8	11,5	79,4	48,0	-24,4
VN14-49-6	65,4 ^{ef}	38,4 ^h	12,1	11,7	79,2	45,2	-26,2
VN14-22-5	73,2 ^{abc}	57,8 ^g	12,6	12,3	92,5	71,5	-22,7
VN14-23-13	72,5 ^{a-d}	55,9 ^g	12,8	12,0	92,9	67,6	-4,8
VN14-87-11	69,6 ^{a-d}	55,5 ^g	12,4	11,9	86,8	66,1	-9,3
VN14-74-1	66,6 ^{def}	43,1 ^h	11,2	10,8	75,2	46,7	-27,7
VN14-45-3	64,8 ^{ef}	37,5 ^h	12,3	11,2	79,7	42,3	-27,6
VN14-41-8	64,8 ^{ef}	40,0 ^h	12,5	11,9	81,2	47,9	-23,4
KU60-1(d/c)	67,6 ^{c-f}	43,8 ^h	10,3	10,1	69,6	44,2	-32,4
TB (A)	69,1 ^a	48,0 ^b	12,1	11,7	84,1	56,6	

CV%=5,46; F_A = 2008,21^{**};
F_B = 19,99^{**}; F_{AB} = 3,61

^{a-h}Các trung bình trong cùng một cột có các chữ cái khác nhau chỉ sự khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$). Các ký tự in hoa khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thông kê các giá trị trung bình giữa các giống/điều kiện tưới. Các ký tự in thường khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa về thông kê giữa các nghiệm thức; **: Khác biệt rất có ý nghĩa mức 0,01.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Cao, D. A. (2020). *Summary of sugar production 2019/20, production plan 2020/21*. Retrieved August 1, 2021, from <https://www.vienmiaduong.vn/vi/loaisach.php?Maloai=5>.
- Cao, D. A. (2015). *Measures to prevent some major diseases on sugarcane in the southern provinces*. Retrieved August 1, 2021, from https://www.vienmiaduong.vn/vi/loaisach.php?pageNum_tailieu=0&totalRows_tailieu=41&Maloai=2.
- Le, S. V. (2005). *Some technical measures to intensively cultivate sugarcane on the gray soil of Binh Duong province* (Unpublished master's thesis). Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Luc, T. T. T., Bui, L. T. T., Mai, T. V., Nguyen, T. T. H., Dang, M. A., & Pham, N. T. M. (2020). Effect of some technical solutions on sugarcane yield under drought conditions in the Central Coast region. *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology* 110(01), 23-28.
- Tran, S. V. (2003). *Sugarcane*. Nghe An, Vietnam: Nghe An Publishing House.

Effects of low-density lipoprotein extracted from egg yolk on preservation of chilled canine semen (4°C)

Van T. Nguyen, Anh T. P. Nguyen, Huy D. Nguyen,
Phuc L. G. Ha, & Khanh T. V. Doan*

Faculty of Animal Science and Veterinary Medicine, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Short communication

Received: July 01, 2021

Revised: September 14, 2021

Accepted: October 01, 2021

Keywords

Canine semen

Low-density lipoprotein

Preservation

*Corresponding author

Doan Tran Vinh Khanh

Email: khanhdoan@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

Low-density lipoprotein (LDL) derived from hen egg yolk has been considered an important component in the storage of canine semen; however, in Vietnam, there have not been many studies regarding this topic. Therefore, this study aimed to evaluate the effectiveness of LDL in the preservation of canine chilled semen in Vietnam. The assessment of semen samples was based on four criteria: storage time, motility, absolute viability, and integrity of acrosomal membrane at motility rate 0.9; 0.5 and 0.3. The semen samples collected were divided into three equal parts, each was then diluted with three different extenders and stored at 4°C. The extenders were LDL + basic extender (LDL), egg yolk + basic extender (EY), and basic extender (C). The storage time of canine semen was recorded from the beginning of monitoring until the motility decreased to 0.3. The storage time of the three extenders was in the order of EY > LDL > C, with 108 h, 60 h, and 48 h, respectively. The absolute viability of fertilizable sperm (Sa5) in the extender was EY (768), LDL (423) and C (280), which was significant ($P < 0.001$). The percentage of viable sperm with intact acrosome membrane at motility time A = 0.9 in LDL was 59.31%, higher than that in EY (30.99%). In the storage period from A = 0.9 to A = 0.5, the acrosome loss percentage of both EY and LDL decreased equally (7.30% and 7.23%), but the storage time of EY (84 h) was longer than that of LDL (48 h). In conclusion, the EY gave a longer storage time, higher absolute viability and longer maintain percentage of viable sperms and intact acrosome membrane compared to the LDL. However, within the first hours of storage, the percentage of viable sperm and intact acrosome membrane in the EY was lower than that in the LDL. Therefore, to preserve canine semen for a short time (less than 48 h), the LDL extender should be used for better effectiveness.

Cited as: Nguyen, V. T., Nguyen, A. T. P., Nguyen, H. D., Ha, P. L. G., & Doan, K. T. V. (2021). Effects of low-density lipoprotein extracted from egg yolk on preservation of chilled canine semen (4°C). *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 8-15.

Ảnh hưởng của lipoprotein tỷ trọng thấp chiết xuất từ lòng đỏ trứng gà trong bảo quản lạnh (4°C) tinh dịch chó

Nguyễn Tử Văn, Nguyễn Thị Phương Anh, Nguyễn Đức Huy,
Hà Lê Gia Phúc & Đoàn Trần Vĩnh Khánh*

Khoa Chăn Nuôi Thú Y, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học (ngắn)

Ngày nhận: 01/07/2021

Ngày chỉnh sửa: 14/09/2021

Ngày chấp nhận: 01/10/2021

Từ khóa

Bảo quản

Lipoprotein tỷ trọng thấp

Tinh dịch chó

*Tác giả liên hệ

Đoàn Trần Vĩnh Khánh

Email: khanhdoan@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Lipoprotein tỷ trọng thấp (LDL) chiết xuất từ lòng đỏ trứng gà đóng vai trò chính trong bảo quản tinh dịch chó, tuy nhiên tại Việt Nam chưa có nhiều nghiên cứu về vấn đề này. Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá tác động của LDL trong bảo quản lạnh tinh dịch chó. Kết quả được đánh giá qua các chỉ tiêu gồm thời gian bảo quản, hoạt lực, sức sống tuyệt đối và tính nguyên vẹn của màng acrosome tại các mức hoạt lực 0,9; 0,5 và 0,3. Ba loại môi trường được sử dụng gồm môi trường căn bản + lòng đỏ trứng gà (EY), môi trường căn bản + LDL (LDL) và môi trường căn bản (C). Thời gian bảo quản tinh dịch chó trong ba loại môi trường từ khi bắt đầu theo dõi đến khi hoạt lực về 0,3 giảm dần theo thứ tự EY > LDL > C, tương ứng với 108 giờ, 60 giờ và 48 giờ. Sức sống tuyệt đối của tinh trùng còn khả năng thụ tinh (Sa5) trong các môi trường lần lượt là EY (768), LDL (423) và C (280), khác biệt rất có ý nghĩa với $P < 0,001$. Tỷ lệ tinh trùng sống - còn nguyên vẹn màng acrosome tại thời điểm hoạt lực = 0,9 trong môi trường LDL (59,31%) cao hơn trong EY (30,99%). Tuy nhiên, khi hoạt lực giảm từ 0,9 đến 0,5 thì tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome ở cả môi trường EY và LDL đều giảm tương đương nhau (7,30% và 7,23%), nhưng thời gian bảo quản của EY (84 giờ) lâu hơn so với LDL (48 giờ). Kết quả cho thấy môi trường EY có thời gian bảo tồn, sức sống tuyệt đối và duy trì tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome tốt hơn môi trường LDL. Tuy nhiên, ngay sau pha chế, tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome đã rất thấp. Do đó, khi bảo quản tinh dịch trong thời gian ngắn (dưới 48 giờ) thì sử dụng LDL sẽ cho kết quả tốt, với tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome cao.

1. Đặt Vấn Đề

Trong những năm gần đây, nuôi chó làm thú cưng đang trở nên phổ biến tại Việt Nam, đặc biệt là các giống chó đẹp, quý hiếm và thân thiện. Từ đó, nhu cầu về nhân giống các giống chó này cũng tăng theo. Phương pháp nhân giống chủ yếu được sử dụng hiện nay là giao phối trực tiếp, phương pháp này gây hao tổn đực giống, dẫn tới giảm thời gian khai thác, cũng vì các lý do trên nên chi phí một lần phối giống khá cao. Vì vậy, gieo tinh nhân tạo trên chó đang dần phổ biến, phương pháp này đảm bảo được sức khỏe của đực giống do một lần khai thác tinh dịch có thể phân thành

nhiều liều tinh và bảo quản dài ngày hơn vì thế giảm số lần khai thác đực giống, đảm bảo sức khỏe và tăng thời gian khai thác.

Để việc gieo tinh nhân tạo đạt hiệu quả cao, ngoài yếu tố kỹ thuật còn phải đảm bảo chất lượng của tinh dịch tốt, do đó môi trường bảo quản tinh dịch trong gieo tinh nhân tạo đóng vai trò quan trọng. Tại nước ta hiện nay, môi trường bảo quản tinh chó còn nhiều hạn chế nên phải nhập khẩu từ nước ngoài với giá thành cao, làm tăng chi phí một lần gieo tinh. Do đó, cần đẩy mạnh các nghiên cứu trong nước về các chất bổ sung trong môi trường bảo quản nhằm cải thiện chất lượng môi trường, giúp giảm chi phí gieo tinh

nhân tạo tại nước ta.

Một trong số các chất thường được sử dụng để bổ sung vào môi trường bảo quản là lòng đỏ trứng gà bởi khả năng bảo vệ tinh trùng khỏi sự sốc lạnh và cung cấp dinh dưỡng trong quá trình bảo quản lạnh (Moussa & ctv., 2002). Tuy nhiên, việc sử dụng lòng đỏ trứng gà tăng khả năng vấy nhiễm vi sinh từ đó làm cho mẫu tinh nhiễm nội độc tố ảnh hưởng đến khả năng thụ tinh. Bên cạnh đó, những nghiên cứu gần đây lại cho rằng phần lớn hiệu quả bảo quản đến từ sự có mặt của lipoprotein tỉ trọng thấp (LDL) trong lòng đỏ trứng (Moussa & ctv., 2002).

Từ những thực tế trên, đề tài nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá tác động của LDL trong bảo quản tinh dịch chó.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Tách chiết LDL từ lòng đỏ trứng gà

2.1.1. Vật liệu

Trứng gà tươi được thu thập trong vòng 24 giờ sau khi đẻ tại trại Nghiên Cứu Ứng Dụng (Applied Research Farm) thuộc Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM. Trứng gà được loại bỏ hoàn toàn phần lòng trắng, phần lòng đỏ được lăn trên giấy (Newstar 101, Trung Quốc) để loại bỏ phần lòng trắng còn sót lại trên màng lòng đỏ. Sau đó, màng lòng đỏ được rách và thu lòng đỏ vào cốc.

2.1.2. Phân tách plasma

Phần bào tương trứng trong lòng đỏ được phân tách theo phương pháp của McBee (Bee & Cotterill, 1979). Lòng đỏ sau khi phân tách được pha loãng bằng một lượng dung dịch NaCl 0,17 M có thể tích tương đương và khuấy bằng máy khuấy từ HI190M (Hanna Instruments, Anh) trong 1 giờ ở 4°C. Dung dịch này được ly tâm bằng máy ly tâm (HERMLE, Đức) ở mức 12.500 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, thu phần nổi (bào tương trứng) loại bỏ phần hạt nhỏ lắng bên dưới.

2.1.3. Chiết xuất LDL

Bào tương trứng (pH $\approx$ 6,0) được trộn với 5% PEG-4000 (HiMedia, Ấn Độ) bằng máy khuấy từ ở 4°C trong 1 giờ. Hỗn hợp này tiếp tục được ly tâm với vận tốc 15.000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút. Phần vật chất nổi là phần giàu LDL được thu lại.

2.2. Bảo quản tinh dịch chó

2.2.1. Thử thí nghiệm

Mẫu tinh dịch được thu nhận từ 1 chó đực, đủ 1 năm tuổi, thuộc giống chó ta có khối lượng 12 kg. Mẫu tinh được thu thập bằng âm đạo giả với tần suất 1 lần/tuần, liên tục trong 20 tuần. Tổng số mẫu tinh thu được là 15 mẫu và sau khi pha loãng có 8 mẫu tinh đạt tiêu chuẩn (hoạt lực trên 0,8, số lượng từ 200×10^6 tinh trùng/lần xuất tinh trở lên, tỷ lệ kỳ hình nhỏ hơn 10% được sử dụng trong thí nghiệm).

2.2.2. Môi trường bảo quản

Mỗi mẫu tinh đạt tiêu chuẩn được chia thành ba phần bằng nhau để pha loãng với 3 loại môi trường bảo quản gồm: môi trường căn bản (C), môi trường căn bản + lòng đỏ trứng gà (EY) và môi trường căn bản + LDL (LDL) (Bảng 1), môi trường căn bản dựa trên môi trường Tris - fructose của Iguer - Ouada & Verstegen (2001). Tất cả các môi trường kể trên đều được điều chỉnh độ pH ở 6,7 – 6,8 bằng thiết bị đo pH của Hanna Instruments, Anh.

2.2.3. Bảo quản lạnh

Mỗi mẫu tinh (đạt tiêu chuẩn sử dụng) được chia thành 3 phần bằng nhau, sau đó mỗi phần sẽ pha loãng với từng loại môi trường theo tỷ lệ 1:1. Sau khi pha loãng tinh dịch sẽ được để ổn định ở nhiệt độ phòng trong 15 phút. Sau đó kiểm tra lại hoạt lực, các mẫu tinh có điểm hoạt lực từ 0,9 trở lên sẽ được chia vào các ống eppendorf 0,5 mL và bảo quản trong tủ lạnh đã cài đặt nhiệt độ ở 4°C.

2.3. Các chỉ tiêu theo dõi

Mẫu tinh sau khi khai thác (tinh nguyên) được kiểm tra thu thập số liệu và đánh giá phẩm chất tinh dịch gồm thể tích (V), hoạt lực (A), nồng độ tinh trùng (C), kỳ hình và tổng số tinh trùng có khả năng thụ tinh (V.A.C).

Mẫu tinh pha chế với môi trường sẽ được kiểm tra, thu thập số liệu để đánh giá thời gian bảo tồn tinh dịch và đánh giá sức sống tuyệt đối (Sa) theo công thức của Nguyen & Nguyen (1997) thông qua việc theo dõi định kỳ sự thay đổi hoạt lực theo thời gian. Sự thay đổi hoạt lực bắt đầu được đánh giá sau khi pha chế 15 phút và định kỳ mỗi

Bảng 1. Môi trường bảo quản tinh dịch¹

Thành phần trong 100 mL	C	EY	LDL
Tris (g)	3,03	3,03	3,03
Glucose (g)	1,25	1,25	1,25
Citrate.natri.2H ₂ O (g)	1,81	1,81	1,81
Penicillin (mg)	100,00	100,00	100,00
Streptomycin (mg)	100,00	100,00	100,00
Lòng đỏ trứng gà (mL)	0,00	20,00	0,00
LDL (g)	0,00	0,00	6,00

¹C: môi trường căn bản; EY: môi trường căn bản + lòng đỏ trứng gà; LDL: môi trường căn bản + low-density lipoprotein (LDL).

12 giờ cho tới khi mức hoạt lực $A = 0,3$. Tại các mức hoạt lực $A = 0,9$ các mẫu tinh sẽ được nhuộm acrosome theo phương pháp của Kovács & Foote (1992) để đánh giá tính nguyên vẹn màng acrosome; tại mức hoạt lực $A = 0,5$ và $A = 0,3$ chỉ nhuộm acrosome theo phương pháp Kovács & Foote 2 mẫu tinh có thời gian bảo tồn cao nhất để đánh giá tính nguyên vẹn màng acrosome.

2.3.1. Phẩm chất tinh dịch

Thể tích (Volume):

Tinh dịch sau khi khai thác được cho vào ống falcon có chia vạch để kiểm tra thể tích tinh dịch.

Đánh giá hoạt lực (Activity):

Tiến hành: nhỏ 1 giọt tinh lên lam kính sạch và khô, sau đó đặt phiến kính lên tiêu bản và đặt lên kính hiển vi xem ở vật kính 10x và 40x.

Xem kính: hoạt lực tinh trùng được đánh giá dựa theo mức hoạt động tiến thẳng của tinh trùng và cho điểm theo thang điểm của Milovanov (1962).

Đánh giá nồng độ (Concentration):

Tiến hành: Sử dụng buồng đếm hồng bạch cầu (Hirschmann, Đức). Pha loãng tinh dịch chó 200 lần bằng NaCl 3%. Dùng micropipette nhỏ hỗn hợp lên buồng đếm đã đầy sẵn phiến kính. Sau đó đặt buồng đếm lên kính hiển vi, tiến hành đếm 5 ô lớn (4 ô bốn góc và 1 ô chính giữa). Khi đếm thì đếm đầu tinh trùng, không đếm lặp lại.

Kết quả được tính theo công thức:

$$C = 50000 \times n \times b = n \times 10^6$$

Trong đó:

C: nồng độ tinh trùng trong 1 mL tinh dịch

n: số lượng tinh trùng đếm được trong 5 ô lớn

b: hệ số pha loãng (200 lần)

Đánh giá kỳ hình:

Sử dụng phương pháp nhuộm Kovács (1992) để kiểm tra kỳ hình tinh trùng.

Tiến hành: Nhỏ 1 giọt tinh dịch chó và 1 giọt trypan blue 0,27% lên lam kính sau đó trộn đều rồi dàn mỏng và để khô. Lam kính tiếp tục được ngâm trong dung dịch cố định (gồm 14 mL formaldehyde, 86 mL HCl 1 N và 0,2 g neutral red) trong 5 phút sau đó rửa với nước cất và để khô. Sau khi nhuộm trong dung dịch Giemsa 7,5% ở 40°C trong 4 - 5 tiếng, lam kính được rửa với nước cất, để khô và kiểm tra ở vật kính x100.

2.3.2. Đánh giá sức sống tuyệt đối của tinh trùng

Theo Nguyen & Nguyen (1997), sức sống tuyệt đối của tinh trùng được tính dựa theo công thức:

$$Sa = \sum at$$

Trong đó:

Sa: chỉ số sức sống tuyệt đối của tinh trùng

a: sức hoạt động thực tế của tinh trùng trong khoảng thời gian giữa hai lần kiểm tra (lần trước và lần sau thời điểm cần tính)

t: thời gian mà tinh trùng duy trì được sức hoạt động a

Thời gian được tính theo công thức:

$$tn = (Tn+1 - Tn-1)/2$$

Trong đó:

tn: thời gian mà tinh trùng có sức hoạt động giữa 2 lần kiểm tra

Tn+1: thời gian bảo quản từ lúc bắt đầu thí nghiệm đến lần kiểm tra sau

Tn-1: thời gian bảo quản từ lúc bắt đầu thí nghiệm đến lần kiểm tra trước

Ngay tại lúc bắt đầu thí nghiệm, vì $n = 0$ nên $Tn-1 = 0$. Do đó, ta có:

$$tn = (Tn = 1)/2$$

Khi kết thúc thí nghiệm vì $T_{n+1} = 0$. Do đó, ta có:

$$t_n = (T_n - T_{n-1})/2$$

2.3.3. Nhuộm màng acrosome của tinh trùng

Tại các thời điểm $A = 0,9$ (thời điểm bắt đầu theo dõi), $A = 0,5$ (thời điểm tinh trùng còn khả năng thụ tinh) và $A = 0,3$ (thời điểm kết thúc theo dõi) các mẫu tinh được tiến hành nhuộm theo phương pháp Kovács & Foote (1992) để kiểm tra tính nguyên vẹn của màng acrosome.

2.4. Xử lý số liệu

Xử lý thông kê bằng phần mềm Minitab (Minitab® 16.2.0, Minitab Pty Ltd, Úc) với mô hình tuyến tính tổng quát (GLM) và xác định mức độ khác biệt ý nghĩa của các nghiệm thức bằng trắc nghiệm F.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Phẩm chất tinh nguyên

Phẩm chất tinh nguyên được thể hiện qua Bảng 2. Thể tích tinh nguyên toàn phần trung bình là 5,81 mL/lần xuất tinh, cao hơn kết quả của một số tác giả tại Việt Nam (Thai, 2005; Bui, 2010). Theo Johnston (1991), thể tích tinh dịch chó thường dao động từ 1 - 30 mL, tuy nhiên thể tích tinh dịch không tương quan với chất lượng tinh dịch trên chó.

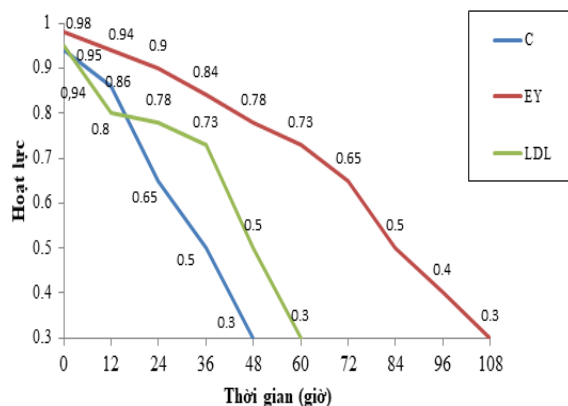
Xét về nồng độ tinh trùng, các mẫu tinh có nồng độ trung bình là $99,38 \times 10^6$ tinh trùng/mL. Theo Freshman (2002), nồng độ tinh trùng của chó nên nằm trong khoảng $250 - 300 \times 10^6$ tinh trùng mỗi đợt xuất tinh. Tổng số tinh trùng có khả năng thụ tinh (VAC) là $575,19 \times 10^6$ tinh trùng, cao hơn kết quả của Thai (2005) và Bui (2010). Tỷ lệ kỳ hình trung bình là 1,88%, thấp hơn kết quả của Iguer - Ouada & Versteegen (2001) là 15%.

3.2. Thời gian bảo tồn

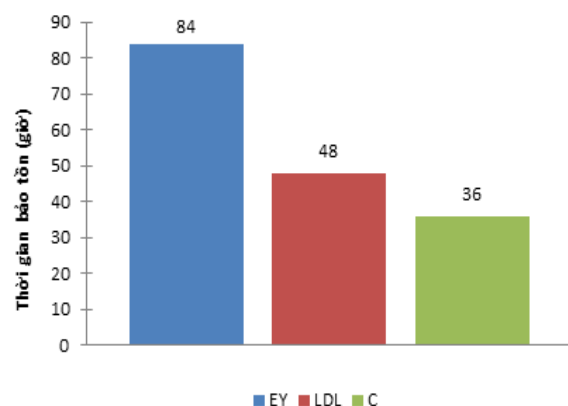
Thời gian bảo tồn giữa các môi trường được thể hiện qua Hình 1.

Tại mức hoạt lực 0,9: Tại thời điểm $A = 0,9$ không có sự khác biệt về thời gian bảo tồn giữa các môi trường với $P > 0,05$.

Tại mức hoạt lực 0,5: Tại $A = 0,5$ (tinh trùng



Hình 1. Thời gian bảo tồn tinh dịch của các môi trường. C: môi trường căn bản; EY: môi trường căn bản + lòng đỏ trứng gà; LDL: môi trường căn bản + low-density lipoprotein (LDL).



Hình 2. Thời gian bảo tồn tinh dịch tại $A = 0,5$. C: môi trường căn bản; EY: môi trường căn bản + lòng đỏ trứng gà; LDL: môi trường căn bản + low-density lipoprotein (LDL).

còn khả năng thụ tinh), môi trường EY (84 giờ) có thời gian bảo tồn dài hơn so với môi trường LDL (48 giờ) và môi trường C (36 giờ) với $P < 0,001$ (Hình 2). Tuy nhiên, giữa môi trường LDL và C khác biệt không có ý nghĩa ($P > 0,05$). Bên cạnh đó, thời gian bảo tồn của Iguer - Ouada & Versteegen (2001) với môi trường Tris - glucose là 13 ngày cao hơn so với môi trường EY. Sự chênh lệch này có thể được lý giải là do các yếu tố như nhiệt độ, khí hậu môi trường, thao tác thực hiện điều kiện phòng thí nghiệm và trứng gà dùng để bổ sung. Ngoài ra, các chất có tác dụng bảo vệ tinh trùng có trong EY như lecithin, các lipoprotein và hàm lượng EY, LDL được bổ sung cũng có thể tác động lên kết quả.

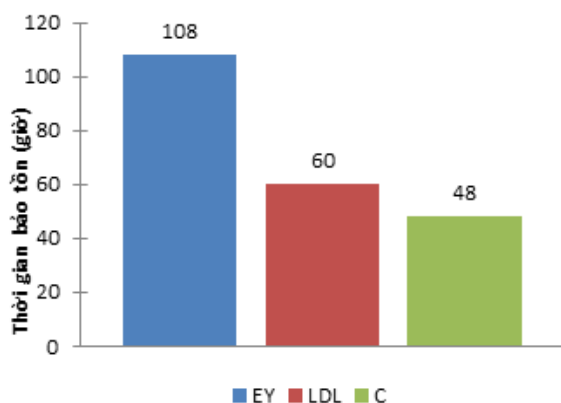
Tại mức hoạt lực 0,3: Thời gian bảo tồn của các

Bảng 2. Phẩm chất tinh nguyên được sử dụng trong thí nghiệm

Số mẫu (n)	Thể tích (mL)	Hoạt lực	Nồng độ (10^6 tinh trùng/mL)	Kỳ hình (%)	Tổng số tinh trùng có khả năng thụ tinh ($\times 10^6$ tinh trùng/lần)
8	$5,81 \pm 1,16$	$0,98 \pm 0,03$	$99,38 \pm 9,68$	$1,88 \pm 1,65$	$569,43 \pm 116,85$

$\pm$: độ lệch chuẩn (SD).

môi trường cho tới khi A = 0,3 được thể hiện qua Hình 3 cho thấy rằng môi trường EY (108 giờ) cho thời gian bảo tồn dài hơn môi trường LDL (60 giờ) và môi trường C (48 giờ) với $P < 0,001$. Môi trường LDL (60 giờ) và C (48 giờ) khác biệt không có ý nghĩa.



Hình 3. Thời gian bảo tồn tinh dịch tại A = 0,3. C: môi trường căn bản; EY: môi trường căn bản + lòng đỏ trứng gà; LDL: môi trường căn bản + low-density lipoprotein (LDL).

3.3. Sức sống tuyệt đối

Nếu chỉ dựa vào thời gian bảo tồn tinh dịch để đánh giá chất lượng của một môi trường bảo quản là chưa đầy đủ mà cần phải theo dõi thêm chỉ số sức sống tuyệt đối của tinh trùng còn khả năng thụ tinh (Sa5) để so sánh khả năng thụ tinh trong quá trình tồn trữ nhằm có thêm cơ sở khẳng định chất lượng của các môi trường bảo quản.

Kết quả Bảng 3 cho thấy sức sống tuyệt đối của tinh trùng còn khả năng thụ tinh (Sa5) khi pha với môi trường EY (768) cao hơn môi trường LDL (423), khác biệt rất có ý nghĩa với $P < 0,001$, thấp hơn kết quả của Bui (2010) là 4001,68. Qua các kết quả trên, môi trường EY có chỉ số Sa5 cao hơn các môi trường còn lại với sự khác biệt rất có ý nghĩa ($P < 0,001$).

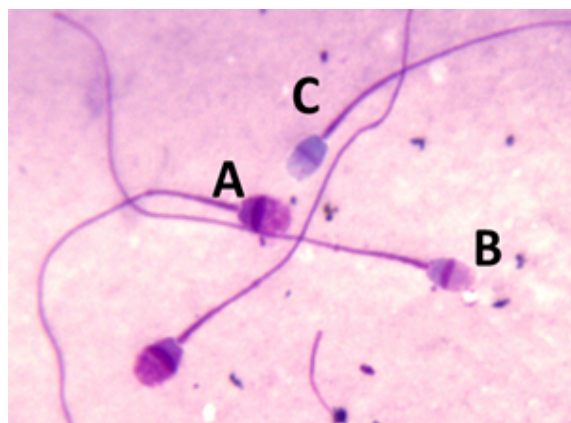
Bảng 3. Sức sống tuyệt đối của tinh trùng còn khả năng thụ tinh (Sa5)

Môi trường	Sa5	P
EY	$768,00^a \pm 144,30$	0,001
LDL	$423,00^b \pm 151,60$	
C	$280,50^c \pm 86,30$	

a, b, c Các trung bình trong cùng một cột có chữ cái theo sau khác nhau thì sự khác biệt rất có ý nghĩa thống kê, với $P < 0,001$, $\pm$ độ lệch chuẩn (SD). C: môi trường căn bản; EY: môi trường căn bản + lòng đỏ trứng gà; LDL: môi trường căn bản + low-density lipoprotein (LDL).

3.4. Tính toàn vẹn của màng acrosome

Tính toàn vẹn của màng acrosome cũng là một chỉ tiêu ảnh hưởng lớn đến khả năng thụ tinh. Do đó, nếu chỉ dựa vào mức hoạt lực A (tỷ lệ số tinh trùng còn sống và có năng lực thụ tinh) thì chưa đảm bảo được khả năng thụ thai của tinh trùng. Vì vậy, tính toàn vẹn của màng acrosome cần được đánh giá tại các mức hoạt lực A = 0,5 và A = 0,3 để khẳng định lại hiệu quả bảo tồn tinh dịch ở phòng thí nghiệm của 2 môi trường tốt nhất. Kết quả nhuộm màng acrosome được phân loại như Hình 4.



Hình 4. Kết quả nhuộm màng acrosome tinh trùng chó (vật kính $\times 100$). A: sống - còn màng acrosome; B: sống - mất màng acrosome; C: chết - mất màng acrosome.

Dựa vào kết quả trong Bảng 4 có thể thấy rằng tại mức hoạt lực A = 0,9 (bắt đầu tính thời gian bảo quản), tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome trong môi trường bổ sung LDL (53,91%) cao hơn so với môi trường bổ sung EY (30,99%) với $P < 0,001$ và tỷ lệ tinh trùng sống - mất màng acrosome của EY (58,40%) cao hơn LDL (34,00%) với $P < 0,05$. Ngay sau khi pha chế tinh dịch màng acrosome ở môi trường bổ sung EY bị hư hại nhiều hơn đáng kể so với môi trường có LDL.

Ở mức hoạt lực A = 0,5, tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome trong môi trường bổ sung EY (23,69%) thấp hơn so với môi trường bổ sung LDL (52,08%) với $P < 0,001$. Tuy nhiên, trong khoảng hoạt lực giảm từ A = 0,9 đến A = 0,5 thì tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome của cả 2 môi trường đều giảm tương đương nhau (7,30% ở môi trường bổ sung EY và 7,23% ở môi trường có bổ sung LDL) và thời gian bảo quản tinh dịch đến mức A = 0,5 của EY (84 giờ) lại dài hơn so với LDL (48 giờ).

Ở mức hoạt lực A = 0,3, tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome ở môi trường bổ sung EY (15,64%) và môi trường bổ sung LDL (13,23%) là tương đương nhau và rất thấp. Điều này làm giảm hiệu quả đậu thai khi gieo tinh trên chó cái là rất lớn.

Kết quả trên có thể thấy môi trường EY có khả năng duy trì tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome tốt hơn so với LDL, nhưng ngay sau khi pha chế tinh dịch thì môi trường EY có tỷ lệ hư hại màng acrosome nhiều hơn môi trường có bổ sung LDL. Việc này có thể do tác động của một số chất có tính ức chế tinh trùng có trong EY ngay sau khi pha chế tinh dịch. Trong thời gian bảo quản tác động của các chất này giảm tác động lên tinh trùng và các chất có lợi cho bảo quản như lecithin, lipoprotein có trong EY phát huy tác dụng bảo quản lên việc bảo vệ và duy trì màng acrosome của tinh trùng tốt hơn LDL. Hàm lượng EY và LDL được bổ sung cũng sẽ có ít nhiều ảnh hưởng đến khả năng bảo vệ màng acrosome của tinh trùng trong thời gian bảo quản.

4. Kết Luận

Môi trường bổ sung EY có thời gian bảo tồn, sức sống tuyệt đối cao hơn môi trường bổ sung LDL và duy trì tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome lâu hơn. Tuy nhiên, ngay sau khi pha chế thì tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome

Bảng 4. Tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome theo mức hoạt lực và môi trường

Môi trường ¹	Sống - còn màng acrosome (%)			Sống - mất màng acrosome (%)		
	A = 0,9	A = 0,5	A = 0,3	A = 0,9	A = 0,5	A = 0,3
	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$	$\bar{X} \pm SD$
EY	30,99 ^a ± 7,90	23,69 ^a ± 6,71	15,64 ^a ± 5,35	58,40 ^c ± 9,99	40,67 ^{cd} ± 10,16	24,50 ^d ± 10,09
LDL	59,31 ^b ± 19,17	52,08 ^b ± 14,21	13,23 ^a ± 7,76	34,00 ^d ± 19,66	31,67 ^d ± 5,95	29,09 ^d ± 14,17
P	0,001			0,0016		

^{a-d} Các trung bình trong cùng một cột theo hoạt lực, theo môi trường có chữ cái theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê.
¹ C: môi trường cân bản; EY: môi trường cân bản + lòng đỏ trứng gà; LDL: môi trường cân bản + low-density lipoprotein (LDL).

đã rất thấp nên có thể ảnh hưởng tới tỷ lệ đậu thai. Do đó, khi bảo quản tinh dịch trong thời gian ngắn (dưới 48 giờ) thì sử dụng LDL sẽ cho kết quả tốt, với tỷ lệ tinh trùng sống - còn màng acrosome cao. Tuy nhiên, cần thực hiện thêm các nghiên cứu về hàm lượng EY và LDL được bổ sung vào môi trường và hiệu quả đậu thai trên thú cái sau bảo quản để đánh giá toàn diện hơn việc dùng môi trường bổ sung EY và LDL để bảo quản tinh dịch trong thời gian dài (trên 48 giờ).

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Lời Cảm Ơn

Tập thể tác giả xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM đã tài trợ kinh phí thực hiện (Mã số: CS - SV - CNTY - 04).

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Bee, L., & Coteerill, O. (1979). Ion-exchange chromatography and electrophoresis of egg yolk proteins. *Journal of Food Science* 44(3), 656-667.
- Bui, H. T. T. (2010). *Preserving ability of some extenders in canine semen* (Unpublished bachelor's thesis). Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Freshman, J. L. (2001). Clinical management of the subfertile stud dog. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 31(2), 259-269.
- Iguer-Ouada, M., & Verstegen, J. P. (2001). Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology* 55(2), 671-684.
- Johnston, S. D. (1991). Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 21(3), 545-551.
- Kovács, A., & Foote, R. H. (1992). Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit spermatozoa. *Biolechnic & Histochemistry* 67(3), 119-124.
- Milovanov, V. K. (1962). *Biology of reproduction and artificial insemination of animals*. Moscow, Russia: Selhozizdat.
- Moussa, M., Martinet, V., Trimeche, A., Tainturier, D., & Anton, M. (2002). Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology* 57(6), 1695-1706.
- Nguyen, A. T., & Nguyen, D. Q. (1997). *Artificial insemination of cattle and poultry*. Ha Noi, Vietnam: Ha Noi Publishing House.
- Thai, H. M. T. (2005). *Possibility of collecting dog semen and preservation effect of some dog semen extenders* (Unpublished master's thesis). Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam.

Detection methods of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and its mutant (mutant-AHPND) in shrimp

Dung H. T. Mai^{1,2}, Binh T. Huynh^{1,2}, Hoan P. K. Nguyen^{1,2}, & Hieu V. Tran^{1,2*}

¹Faculty of Biology and Biotechnology, University of Science, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Vietnam National University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Short communication

Received: July 09, 2021

Revised: August 02, 2021

Accepted: August 11, 2021

Keywords

AHPND

Detection methods

ToxA

ToxB

V. parahaemolyticus

*Corresponding author

Tran Van Hieu

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

ABSTRACT

Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) is a globally serious threat, especially for Vietnam shrimp culture since its first discovery in China in 2009. This disease is caused by toxin-carrying bacteria *Vibrio parahaemolyticus* whose plasmid encodes for a binary toxin ToxA and ToxB. The disease has a mortality rate of up to 100% after 3 - 5 days post-infection and fast spread among shrimp culturing regions. In 2017, a bacterial strain *V. parahaemolyticus* XN87 containing plasmid with mutant toxA and normal toxB genes was found. In this mutant form, shrimp did not show hepatopancreatic necrosis symptoms, but the early mortality rate in shrimp was still up to 50%. This mutation was called mutant-AHPND. Depending on different purposes and subjects, the corresponding detection method will be selected. Understanding the specific nature and application of each method is essential for the prevention and treatment of AHPND disease in shrimp to minimize economic losses for shrimp farmers. In this review, we summarized AHPND-detected methods based on detecting genes (toxA and toxB) or protein (ToxA and/or ToxB toxins) as well as a method for early detection of the mutant-AHPND. Eventually, potential detection methods are also addressed and discussed.

Cited as: Mai, D. H. T., Huynh, B. T., Nguyen H. P. K., & Tran, H. V. (2021). Detection methods of Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND) and its mutant (mutant-AHPND) in shrimp. *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 16-27.

Các phương pháp phát hiện bệnh Hoại tử gan tụy cấp (AHPND) và dạng đột biến (mutant-AHPND) trên tôm

Mai Hoàng Thùy Dung^{1,2}, Huỳnh Tuấn Bình^{1,2},
Nguyễn Phước Khải Hoàn^{1,2} & Trần Văn Hiếu^{1,2*}

¹Khoa Sinh Học - Công Nghệ Sinh Học, Trường Đại Học Khoa Học Tự Nhiên TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Đại Học Quốc Gia TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học (ngắn)

Ngày nhận: 09/07/2021

Ngày chỉnh sửa: 02/08/2021

Ngày chấp nhận: 11/08/2021

Từ khóa

AHPND

Phương pháp phát hiện

ToxA

ToxB

V. parahaemolyticus

*Tác giả liên hệ

Trần Văn Hiếu

Email: tvhieu@hcmus.edu.vn

TÓM TẮT

Bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) là mối đe dọa nghiêm trọng trên toàn cầu, đặc biệt đối với ngành nuôi tôm Việt Nam kể từ lần phát hiện đầu tiên tại Trung Quốc năm 2009. Bệnh này do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* mang plasmid mã hóa cho cặp nhị độc tố ToxA và ToxB gây ra. Bệnh có tỷ lệ chết lên đến 100% sau 3 - 5 ngày kể từ khi nhiễm bệnh và lây lan nhanh giữa các vùng nuôi tôm. Năm 2017, một dạng đột biến của căn bệnh này có tên mutant-AHPND được ghi nhận với một đoạn transposon 1053 bp chèn vào gen *toxA* trong khi gen *toxB* không bị ảnh hưởng nhưng tỷ lệ chết vẫn lên đến 50% và bệnh vẫn lây lan nhanh chóng. Tùy theo mục đích và đối tượng khác nhau mà phương pháp phát hiện tương ứng sẽ lựa chọn. Việc hiểu rõ bản chất và ứng dụng cụ thể của từng phương pháp đóng vai trò rất cần thiết cho công tác phòng ngừa, xử lý dịch bệnh AHPND trên tôm nhằm giảm thiểu thiệt hại kinh tế cho người nuôi tôm. Bài tổng quan này tổng hợp các phương pháp phát hiện bệnh thông qua phát hiện gen (*toxA* và *toxB*) hay protein (độc tố ToxA và/hoặc ToxB) cũng như phương pháp phát hiện sớm dạng đột biến đang được ứng dụng hiện nay. Cuối cùng, một số biện pháp phát hiện tiềm năng khác cũng được thảo luận.

1. Đặt Vấn Đề

Hoạt động nuôi tôm cung cấp đến 55% sản lượng tôm toàn cầu. Ở châu Á, sản lượng tôm đã phục hồi kể từ năm 2015, đạt 3,75 triệu tấn vào năm 2018 và có khả năng tăng lên 4,00 triệu tấn vào năm 2021 (GOAL, 2019). Ở khu vực các nước Châu Mỹ - La tinh, sản lượng tôm của Ecuador dự kiến đạt 700.000 tấn vào năm 2021, với tốc độ tăng trưởng 11,3% từ năm 2015 đến năm 2020. Sự tăng trưởng này được dự đoán sẽ đưa Ecuador trở thành nhà sản xuất lớn thứ ba trên thế giới sau Trung Quốc và Việt Nam (GOAL, 2019). Các kỹ sư và chuyên gia trong ngành của Đại học Florida dự đoán rằng sản lượng tôm thế giới sẽ tăng 5% vào năm 2020 lên trên 5 triệu tấn (GOAL, 2019). Từ đó cho thấy được ngành nuôi tôm hứa hẹn mang lại lợi nhuận cao, nguồn lợi kinh tế lớn cho

các nước đã và đang phát triển.

Tuy ngành nuôi tôm Việt Nam đã ra đời và phát triển từ lâu nhưng mãi tới giai đoạn sau năm 2003 mới được đầu tư và phát triển cạnh tranh với các nước khác trên thế giới. Trong giai đoạn 2015 đến 2021, năm 2015 ngành tôm Việt Nam không được thuận lợi do ảnh hưởng từ biến đổi thời tiết, và biến động tỷ giá trong nước. Nhưng từ 2016 đến nay, nhờ nhu cầu tiêu thụ tôm tăng trong khi nguồn cung trên thế giới giảm nên xuất khẩu tôm hồi phục và liên tục tăng trưởng (VASEP, 2018). Năm 2019, Việt Nam là quốc gia nuôi tôm lớn thứ hai trên thế giới (GOAL, 2019) với khoảng 160 doanh nghiệp tham gia chế biến, xuất khẩu tôm, tập trung chủ yếu ở Miền Trung, Nam Trung Bộ (Khánh Hòa, Phú Yên, Ninh Thuận, ...), Đồng Bằng Sông Cửu Long (Long An, Tiền Giang, Bến Tre, Trà Vinh, Sóc Trăng, Cà Mau, Kiên Gi-

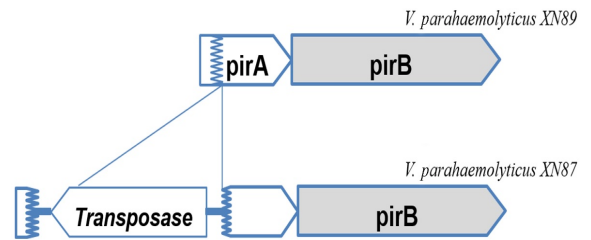
ang,...), với tổng công suất chế biến đạt gần 1 triệu tấn sản phẩm/năm (VASEP, 2019).

Tuy nhiên, sự phát triển của ngành nuôi tôm Việt Nam cũng gặp nhiều khó khăn, thách thức lớn. Giá nguyên liệu đầu vào khá cao, chất lượng tôm giống thấp, sản xuất nuôi tôm nhỏ lẻ, kỹ thuật thấp, giá thức ăn cao và không kiểm soát dẫn đến sản xuất chưa ổn định và nghề nuôi tôm kém bền vững (MARD, 2015). Bên cạnh đó, điều đáng lo ngại hàng đầu là hiện tượng biến đổi khí hậu toàn cầu làm phát sinh hàng loạt dịch bệnh nghiêm trọng trên tôm khiến nhiều hộ nuôi tôm rơi vào cảnh thua lỗ hay mất trắng, gây đe dọa đến sự phát triển bền vững của ngành công nghiệp nuôi tôm và những tổn thất nghiêm trọng về kinh tế. Điển hình trong đó là bệnh Hoại tử gan tụy cấp (Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease - AHPND) theo MARD (2015).

Bệnh AHPND trước đây được gọi với tên Hội chứng tôm chết sớm (EMS) vì nó có thể gây ra tỷ lệ chết hàng loạt, đột ngột lên đến 100% ở tôm có thể quan sát thấy trong vòng 30 - 35 ngày sau khi thả nuôi. Bệnh AHPND gây thiệt hại kinh tế hàng năm lên tới hàng tỷ đô la kể từ đợt bùng phát đầu tiên ở Trung Quốc vào năm 2009 và liên tiếp ảnh hưởng đến các nước Đông Nam Á khác như Việt Nam (2010), Malaysia (2011), Thái Lan (2012), Philippines (2013), và Mexico (2013) (Santos & ctv., 2020).

Tác nhân gây bệnh AHPND là *Vibrio parahaemolyticus*, một loại vi khuẩn Gram âm hình que có mặt ở khắp nơi trong tự nhiên. *V. parahaemolyticus* gây AHPND có hại cho tôm nhưng không gây hại cho con người (Santos & ctv., 2020). Plasmid được tìm thấy ở các loài *Vibrio* gây bệnh chứa gen mã hóa các độc tố gây AHPND, là độc tố PirA và PirB làm bong tróc các tế bào biểu mô ống gan tụy của tôm, làm tôm chết hàng loạt (Xiao & ctv., 2017). Năm 2017, một nhóm nghiên cứu ở Thái Lan đã phân lập được chủng *Vibrio parahaemolyticus* XN87 chứa plasmid pVA1 đột biến không tạo ra độc tố PirA và không gây ra những dấu hiệu lâm sàng của bệnh AHPND nhưng vẫn gây chết tôm với tỷ lệ 50% (Phiwsaiya & ctv., 2017) nên gọi là AHPND dạng đột biến (mutant-AHPND). Chủng *V. parahaemolyticus* (XN87) chứa plasmid pVA1 đột biến với việc chèn trình tự transposon vào gen pirAvp của nó theo như mô tả ở Hình 1.

Bệnh AHPND lây lan với tốc độ nhanh là mối nguy rất lớn đối với các khu vực nuôi tôm trọng điểm có nhiều ao gần nhau, vì khi một ao nuôi



Hình 1. Sơ đồ tỉ lệ của vùng gen độc tố pirAvp và pirBvp trong plasmid pVA1 bình thường và trong plasmid đột biến của XN87 với đoạn gen transposon được chèn vào gen pirAvp (Phiwsaiya & ctv., 2017).

có bệnh nếu không kịp thời phát hiện và có biện pháp cách ly khoanh vùng ổ dịch thì khả năng lây lan sang các ao khác là rất lớn, dẫn đến tổn thất diện rộng. Chúng xâm chiếm đường tiêu hóa của tôm và tạo ra độc tố gây phá hủy mô và rối loạn chức năng của gan tụy, cơ quan tiêu hóa của tôm. Dịch bệnh này thường xảy ra ở tôm sú và tôm thẻ chân trắng. Khi bị nhiễm bệnh, tôm có biểu hiện ngừng ăn, bơi chậm, vỏ mỏng, màu tôm nhợt nhạt, gan tụy mềm, dễ vỡ, sưng to, đổi màu, và chết. Tôm bị bệnh lâu ngày có gan tụy teo, dai, nhạt màu, ruột trống không chứa thức ăn. Tỷ lệ chết có thể lên đến 100% chỉ sau 3 - 5 ngày bệnh, khi công bố dịch phải tiêu hủy toàn bộ ao tôm (MARD, 2016).

Bệnh AHPND gây thiệt hại lớn đối với ngành tôm Việt Nam. Năm 2016, bệnh xảy ra ở 305 xã của 82 huyện thuộc 25 tỉnh thành với tổng diện tích bệnh lên đến 6339,15 ha và diện tích vùng nuôi tôm bị nhiễm bệnh đang có dấu hiệu tăng theo thời gian (Lua & ctv., 2016). Các phương pháp sử dụng hiện nay để chẩn đoán bệnh AHPND dựa trên hai mục tiêu chính là phát hiện gen gây bệnh hoặc phát hiện protein gây bệnh. Trong bài tổng quan này, các phương pháp phát hiện phổ biến và bổ sung thêm các phương pháp mới nhất hiện nay đã được tổng hợp nhằm phục vụ công tác chẩn đoán, và phòng chống AHPND cho người nuôi tôm.

2. Phát Hiện AHPND Dựa Trên Gen

2.1. Phương pháp PCR (monoplex PCR)

Để hỗ trợ xác định bệnh ở các ao nuôi, cần dùng phản ứng khuếch đại gen (PCR). Phương pháp phân tích này nhằm xác định DNA của mầm bệnh có hay không tồn tại trong mẫu kiểm tra dựa vào việc xác định đoạn DNA đích có được

Bảng 1. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phương pháp AP3

Thành phần	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt
10X PCR buffer	2,5	Tiền biến tính 94°C, 5 phút
50 mM MgCl ₂	0,7	30 chu kỳ
10 mM dNTPs	0,4	Biến tính 94°C, 30 giây
10 μM mỗi F	0,5	Bắt cặp mỗi 53°C, 30 giây
10 μM mỗi R	0,5	Kéo dài mỗi 72°C, 40 giây
Taq DNA polymerase	0,2	Kéo dài cuối 72°C, 5 phút
Tổng cộng	25,0	

Nguồn: Sirikharin & ctv. (2014).

Bảng 2. Thành phần phản ứng và chu trình nhiệt của phương pháp monoplex PCR

Thành phần	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt
10X PCR buffer	2,0	Tiền biến tính 95°C, 10 phút
50 mM MgCl ₂	0,8	29 chu kỳ
10 mM dNTPs	0,8	Biến tính 95°C, 30 giây
10 μM mỗi F	0,6	Bắt cặp mỗi 60°C, 30 giây
10 μM mỗi R	0,6	Kéo dài mỗi 72°C, 15 giây
Taq DNA polymerase	0,1	Kéo dài cuối 72°C, 5 phút
Tổng cộng	20,0	Làm mát 25°C, 2 phút

Nguồn: Mai-Hoang & ctv. (2021).

khuyết đại hay không. Flegel & Lo (2014) đã cùng phát triển phương pháp PCR để phát hiện vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm. Hai cặp mồi được đặt tên là AHPND primer set 1 (AP1) và AHPND primer set 2 (AP2) phát hiện hai vùng biên của đoạn gen mã hóa cho hai loại độc tố. Tuy nhiên trong các thử nghiệm của mình, nhóm nghiên cứu ghi nhận một mẫu dương tính với AP1 nhưng lại âm tính với AP2, điều đó cho thấy hai cặp mồi trên vẫn chưa chính xác tuyệt đối (Santos & ctv., 2020).

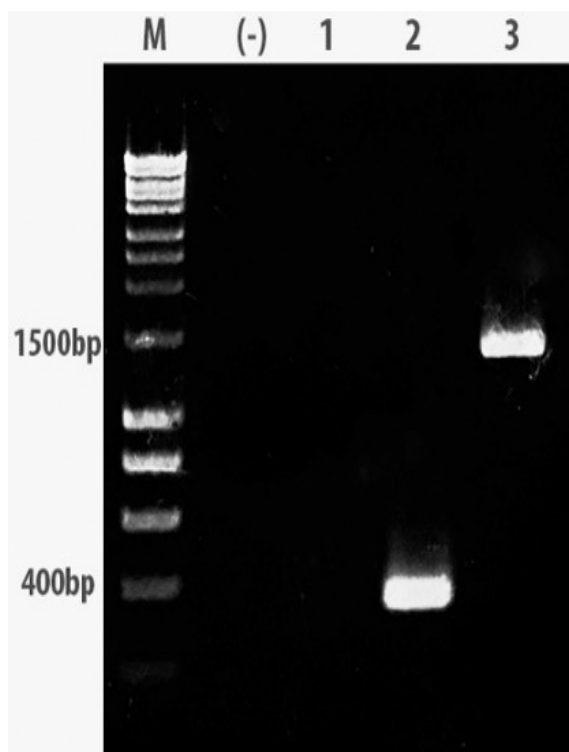
Phương pháp PCR cải tiến (gọi là AP3) để phát hiện bệnh hoại tử gan tụy cấp đã được phát triển bởi Sirikharin & ctv. (2014), nhóm nghiên cứu đề nghị rằng AP3 primer sẽ thay thế AP1 và AP2 đã công bố trước đó. Bệnh hoại tử gan tụy cấp do hai độc tố PirA_{vp} và PirB_{vp} gây ra nên Sirikharin và cộng sự đã thiết lập cặp mồi đơn phát hiện độc tố PirA_{vp}. Mẫu tôm nghi ngờ bệnh sẽ trải qua bước tiền tăng sinh trong bốn giờ ở 30°C dưới điều kiện lắc, sau đó tách plasmid và thực hiện PCR chẩn đoán với cặp mồi như Bảng 5. Thành phần và chu trình nhiệt của phương pháp được thực hiện như Bảng 1.

Với các kết quả về độ nhạy và độ đặc hiệu, nhóm nghiên cứu đã tối ưu hóa và đưa ra quy trình cụ thể để phát hiện bệnh bằng cặp mồi AP3 (Sirikharin & ctv., 2014). Tuy nhiên, khi lượng *V.*

parahaemolyticus trong mẫu ở mức thấp (nhỏ hơn 10 ng plasmid pVA1), phương pháp AP3 có thể không phát hiện được bệnh, dẫn đến đưa ra kết quả âm tính giả, không chính xác và AP3 không phát hiện được chủng gây Hoại tử gan tụy cấp đột biến (mutant-AHPND).

Mai-Hoang & ctv. (2021) đã thiết lập phản ứng PCR sử dụng một cặp mồi duy nhất là GMIF1-2 có thể phát hiện đồng thời AHPND và mutant-AHPND. Cặp mồi này khuếch đại toàn bộ gen *toxA*, 12 nucleotides ở giữa hai gen và một phần gen *toxB*; do đó mồi có khả năng phát hiện cả gen *toxA* bị đột biến của chủng gây mutant-AHPND. Phản ứng PCR được thiết lập bởi cặp mồi này có độ nhạy cao hơn gấp bốn lần phương pháp AP3 đã công bố trước đó và có thể phát hiện chủng gây bệnh AHPND với thời gian kéo dài trong chu trình nhiệt với 5 giây (Hình 2). Phản ứng được thực hiện với thành phần và chu trình nhiệt như Bảng 2 với cặp mồi được thể hiện trong Bảng 5.

Phản ứng PCR này được thiết lập dựa trên hai tiêu chí tiết kiệm thời gian và chi phí. Ngoài ra, xác định các thông số tối ưu của phản ứng dựa trên sự kết hợp của các phần mềm Photoshop (xử lý hình ảnh), ImageJ (cung cấp các thông số về độ sáng của các vạch) và Graphpad Prism5 (thống kê về sự khác biệt có nghĩa của các vạch) đã cải thiện độ chính xác và khách quan hơn so



Hình 2. Kết quả cho thấy cặp mồi GMIF1-2 cho phản ứng PCR phát hiện đồng thời AHPND (vạch 366 bp) và mutant-AHPND (1429 bp). M: thang chuẩn 1 kb; (-): chứng âm; 1: chủng không gây AHPND; 2: chủng AHPND; 3: chủng mutant-AHPND (Mai-Hoang & ctv., 2021).

với phương pháp quan sát bằng mắt (Mai-Hoang & ctv., 2021).

2.2. Các biến thể của phương pháp PCR

2.2.1. Phương pháp nested PCR (AP4)

Tuy phương pháp PCR sử dụng cặp mồi AP3 có độ đặc hiệu 100%, nhưng đối với các mẫu có lượng mầm bệnh thấp cần phải trải qua bước tiền tăng sinh trong bốn giờ trước khi tách các tế bào vi khuẩn để chuẩn bị mẫu DNA cho xét nghiệm PCR. Để giải quyết vấn đề đó, Dangtip & ctv. (2015) đã phát triển phương pháp nested PCR được gọi là AP4 với cặp mồi ngoài khuếch đại toàn bộ vùng gen độc tố; cặp mồi trong khuếch đại một phần gen *toxA*, 12 nucleotides nằm giữa hai gen và một phần gen *toxB* dựa trên khuôn là sản phẩm tạo thành từ cặp mồi ngoài. Do đó, phương pháp AP4 có độ nhạy cao hơn 100 lần so với AP3 (Dangtip & ctv., 2015). Phương pháp

có thành phần và chu trình được thực hiện như Bảng 3 với các cặp mồi được thể hiện trong Bảng 5.

Phương pháp PCR với độ nhạy và độ đặc hiệu cao cùng với đó là thời gian tiến hành nhanh giúp phát hiện bệnh một cách nhanh chóng. Tuy nhiên, AP4 không thể phát hiện được mutant-AHPND, độ nhạy cao cũng là một mối nguy dẫn đến việc dương tính giả nếu phòng thí nghiệm không đảm bảo tiêu chuẩn. Ngoài ra, AP4 đòi hỏi hai bước khuếch đại dẫn đến tốn thời gian và không phù hợp cho công tác chẩn đoán lâu dài.

2.2.2. Phương pháp multiplex PCR

Năm 2018, phương pháp phát hiện PCR 5-plex mới đã được phát triển và thử nghiệm thành công khi kết hợp các đoạn mồi nhằm mục tiêu các gen *pirAvp*, *pirBvp*, *tlh*, *toxR* (hoặc *tetB*) và 16S rRNA. Thành phần và chu trình nhiệt của phương pháp được thực hiện như Bảng 4 với các cặp mồi được thể hiện trong Bảng 5.

Với phương pháp này, các chủng AHPND *V. parahaemolyticus* hoặc kháng tetracycline AHPND *V. parahaemolyticus* có thể được phát hiện trong một phản ứng PCR duy nhất. Việc nhanh chóng xác định các mầm bệnh tiềm ẩn là điều cần thiết để kiểm soát sự lây lan của bệnh. Chẩn đoán các gen mục tiêu thì phụ thuộc rất nhiều vào quá trình chiết tách axit nucleic. Nếu quá trình này có sai sót sẽ dẫn đến kết quả âm tính giả hay định lượng không chính xác. Để kiểm soát quá trình chiết tách, nhóm nghiên cứu đã sử dụng cặp mồi cho gen chứng nội để áp dụng vào xét nghiệm cùng với mẫu bệnh. Chứng nội được sử dụng là gen có biểu hiện bên trong tế bào như gen rRNA 16S. Sự hiện diện của đoạn mồi nhắm vào gen rRNA 16S cho phép chỉ ra phản ứng PCR âm tính giả vì gen luôn được khuếch đại trong phản ứng PCR, điều này làm tăng thêm độ tin cậy của kết quả (Devadas & ctv., 2019). Tuy nhiên, phương pháp multiplex PCR có nhiều cặp mồi sẽ dẫn đến các kết quả không đặc hiệu, quá trình tối ưu hóa phức tạp. Ngoài ra, vì hai gen *toxA* và *toxB* có vị trí cạnh nhau trên cùng một plasmid nên việc thiết kế các cặp mồi khác nhau để khuếch đại gen là không cần thiết.

2.2.3. Phương pháp real-time PCR

Ban đầu, chẩn đoán AHPND chỉ có thể được thực hiện thông qua kiểm tra mô học và xét nghiệm sinh học trong phòng thí nghiệm (MARD,

Bảng 3. Thành phần hóa chất và chu trình nhiệt của phương pháp AP4

Thành phần	Bước 1		Bước 2	
	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt
10X PCR buffer	2,5	Tiền biến tính 94°C, 2 phút	2,5	Tiền biến tính 94°C, 2 phút
50 mM MgCl ₂	1,5	30 chu kỳ	1,5	25 chu kỳ
10 mM dNTPs	0,5	Biến tính 94°C, 30 giây	0,5	Biến tính 94°C, 20 giây
10 μM mỗi F1	0,5	Bắt cặp mỗi 55°C, 30 giây	0,375	Bắt cặp mỗi 55°C, 20 giây
10 μM mỗi R1	0,5	Kéo dài mỗi 72°C, 90 giây	0,375	Kéo dài mỗi 72°C, 20 giây
Taq DNA polymerase	0,3	Kéo dài cuối 72°C, 2 phút	0,3	Kéo dài cuối 72°C, 2 phút
Tổng cộng	25,0		25,0	

Nguồn: Dangtip & ctv. (2015).

2016). Sau đó, các phương pháp chẩn đoán phân tử dựa trên thử nghiệm phản ứng chuỗi polymerase thông thường nhắm vào các gen pirA và/hoặc pirB đã xuất hiện (Dangtip & ctv., 2015). Tuy nhiên, định lượng mầm bệnh AHPND ở động vật bị nhiễm bệnh là một trong những tiêu chí quan trọng nhất để theo dõi sự tiến triển của bệnh.

Số lượng vi khuẩn có thể được xác định thông qua đếm các đơn vị hình thành khuẩn lạc (CFU – colony forming unit), nhưng phương pháp này tốn nhiều thời gian và công sức. Phân tích chuỗi phản ứng polymerase định lượng (qPCR) theo thời gian thực đã trở thành một giải pháp thay thế hấp dẫn nhờ các ưu điểm về tốc độ, độ nhạy và độ đặc hiệu. Han & ctv. (2015c) đã thiết lập phương pháp Taqman qPCR để phát hiện gen toxA trên plasmid gây bệnh và hiện nay vẫn được sử dụng cho việc chẩn đoán AHPND. Phản ứng qPCR này sử dụng bộ kit Taqman Faster Universal PCR Master Mix của hãng Life Technologies. Mẫu DNA được thêm vào thành phần phản ứng chứa 0,3 μM mỗi đoạn mỗi và 0,1 μM đoạn mẫu dò Taqman để đạt thể tích cuối là 10 μL. Chu trình nhiệt của phản ứng qPCR gồm tiền biến tính ở 95°C trong 20 giây, lặp lại 40 chu kỳ với bước biến tính 95°C trong 3 giây và tiếp theo là 60°C trong 30 giây. Phân tích tín hiệu khuếch đại với hệ thống PCR StepOnePlus của hãng Life Technologies (Han & ctv., 2015c).

Cruz-Flores & ctv. (2019) đã phát triển một phản ứng multiplex-qPCR sử dụng SYBR Green để phát hiện pirA, pirB và hai gen chứng nội là gen 18S rRNA của tôm và gen 16S rRNA của vi khuẩn trong một phản ứng duy nhất. Các đoạn mỗi pirB khuếch đại đầu 3' của gen pirB cho phép phát hiện *Vibrio* spp. thể đột biến chứa pirA bị mất hoàn toàn và pirB bị mất một phần. Phản ứng cũng phát hiện các đột biến có chứa toàn bộ gen pirA và loại bỏ gen pirB. Vì cả hai gen độc tố đều cần thiết cho sự phát triển của bệnh, nên phản ứng này có thể phân biệt giữa các chủng vi khuẩn *Vibrio* spp. gây AHPND ở tôm và các thể đột biến không gây bệnh. Ngoài ra, một phản ứng duplex-qPCR đã được thực hiện bằng cách thiết kế các đầu dò TaqMan cho các mỗi pirA và pirB. Độ nhạy và độ đặc hiệu chẩn đoán được so sánh giữa hai phương pháp SYBR Green và TaqMan. Cả hai loại phản ứng đều cho thấy độ nhạy tương tự nhau với giới hạn phát hiện là 10 bản sao đối với pirA và pirB, và không phản ứng nào cho thấy bất kỳ phản ứng chéo nào với các

Bảng 4. Thành phần hóa chất và chu trình nhiệt của phương pháp 5-plex PCR

Thành phần	Thể tích (μL)	Chu trình nhiệt	
5X PCR buffer	5,0	Tiền biến tính	94°C, 5 phút
25 mM MgCl_2	3,0		35 - 40 chu kỳ
10 mM dNTPs	1,0	Biến tính	94°C, 30 giây
2,5 μM các mồi F	0,25	Bắt cặp mồi	50-60°C, 30 giây
2,5 μM các mồi R	0,25	Kéo dài mồi	63 - 73°C, 50-60 giây
Taq DNA polymerase	0,2	Kéo dài cuối	72°C, 5 phút
Tổng cộng	20,0	Bảo quản	10°C

Nguồn: Devadas & ctv. (2019).

mầm bệnh vi khuẩn và virus đã biết khác ở tôm. Độ nhạy cao của cả hai phương pháp làm cho chúng phù hợp để phát hiện các bản sao thấp của gen *pirA* và *pirB* trong vi khuẩn *Vibrio* spp. gây ra AHPND cũng như để phát hiện các đột biến không gây bệnh. Do đó, các phương pháp real-time PCR với độ nhạy và độ đặc hiệu cao, giúp giảm thiểu đáng kể thời gian dùng để xét nghiệm so với các phương pháp PCR đơn mồi hay nested PCR (Cruz-Flores & ctv., 2019). Tuy nhiên, các phương pháp real-time PCR cũng đi kèm với những nhược điểm như cần các thiết bị đắt tiền, chi phí hóa chất cao. Bên cạnh đó, các phản ứng real-time PCR cũng không phát hiện được mutant-AHPND.

Phương pháp PCR hiện đang được xem như phương pháp chuẩn hiện nay trong công bố dịch AHPND. Vì thế, phương pháp PCR nhanh và chính xác sẽ là sự lựa chọn của các Chi cục Thú y và Thủy sản các tỉnh trong công tác công bố dịch để xử lý nhanh ao nuôi khi cần. Tuy nhiên, các phương pháp dựa trên gen hiện nay cần điều kiện phòng thí nghiệm phù hợp, kỹ thuật viên được đào tạo nên không thể sử dụng trực tiếp tại thực địa được.

3. Phát Hiện AHPND Dựa Trên Protein

3.1. Phương pháp ELISA

ELISA là một kỹ thuật sinh hóa được dùng trong miễn dịch học để có thể phát hiện sự có mặt của những kháng thể hay kháng nguyên trong mẫu phục vụ chẩn đoán bệnh. Nguyên lý của kỹ thuật ELISA dựa vào tính đặc hiệu của kháng nguyên với kháng thể và được thực hiện bằng những bước cơ bản sau: kháng nguyên hoặc kháng thể đã biết được gắn trên một giá thể rắn, sau đó cho mẫu có chứa kháng thể hoặc kháng nguyên cần tìm vào giếng. Bổ sung thêm kháng thể có gắn với enzyme. Bước cuối cùng thêm cơ chất, en-

zyme sẽ biến đổi cơ chất này và tạo tín hiệu màu có thể xác định được bằng máy đo huỳnh quang. Về cơ bản, ELISA được phân loại thành ELISA trực tiếp, ELISA gián tiếp và sandwich ELISA (Crowther, 1995). Một phương pháp ELISA gián tiếp (iELISA) đã được phát triển để phát hiện cặp độc tố ToxA/ToxB trong chẩn đoán AHPND. Phương pháp này cho thấy kháng thể kháng độc tố toxA và toxB có thể phát hiện cả hai loại độc tố ở 29/30 mẫu tôm đã được gây bệnh AHPND với ngưỡng phát hiện ở mức 0,8 ng độc tố/mL, trong khi đó phương pháp real-time PCR có thể phát hiện được gen độc tố ở 30/30 mẫu tôm. Phương pháp iELISA cũng không cho tín hiệu đối với tất cả mẫu tôm âm tính được thử nghiệm. Nghiên cứu này chỉ ra rằng iELISA là một phương pháp đáng tin cậy để phát hiện PirAvp và độc tố Pir-Bvp trong tôm nhiễm bệnh và sẽ là một công cụ hữu ích trong chẩn đoán AHPND và nghiên cứu vai trò của độc tố nhị phân trong cơ chế gây bệnh AHPND (Mai & ctv., 2020). Tương tự, thử nghiệm iELISA với kháng thể đa dòng kháng ToxB với ngưỡng phát hiện đạt ở mức 0,1 ng độc tố/mL cũng được công bố bởi Duong & ctv. (2021).

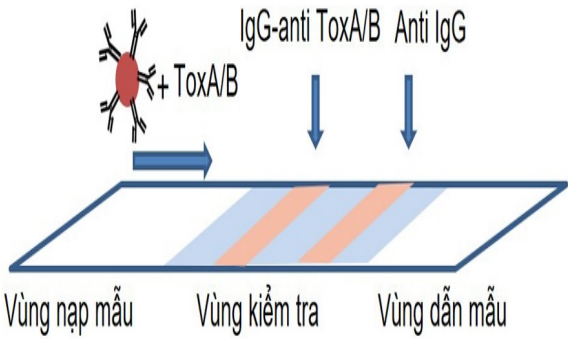
3.2. Phương pháp miễn dịch dòng chảy ngang (Lateral flow assay – LFA)

Bắt cập của các phương pháp trên đưa ra yêu cầu cần một phương pháp phù hợp hơn cho việc phát hiện chính xác, nhanh chóng, và thực hiện tại thực địa đối với bệnh hoại tử gan tụy cấp. Que thử miễn dịch hoạt động theo cơ chế thử nghiệm miễn dịch dòng chảy ngang (Lateral flow assay – LFA) cho thấy tiềm năng trong việc phát triển phương pháp phát hiện AHPND. Cấu trúc của một que thử miễn dịch bao gồm: vùng nạp mẫu, vùng cộng hợp, vùng kiểm tra, vùng dẫn mẫu (Hình 3). Vùng nạp mẫu là nơi mẫu thử được đưa vào que để sau đó được dẫn tuần tự

Bảng 5. Các phương pháp PCR khuếch đại toxA, toxB

Tên phương pháp	Cặp mồi (5'-3')	Gen mục tiêu	Kích thước (bp)	Tác giả
AP3	AP3-F: ATGAGTAACAATATAAAAAACATGAAAC AP3-R: GTGGTAATAGATTGTACAGAA	PirAvp	333	Sirikharin & ctv., 2014
	Bước 1 AP4-F1(=AP3-F): ATGAGTAACAATATAAAAAACATGAAAC AP4-R1: ACGATTTCGACGTTCCCCAA	PirAvp và một phần lớn PirBvp	1269	Dangtip & ctv., 2015
AP4 (hai bước)	Bước 2 AP4-F2: TTGAGAAATACGGGACGTGGG AP4-R2: GTTAGTCATGTGAGCACCTTC	PirAvp (209bp) PirBvp (9bp)		
Taqman qPCR	VpPirA_F: TTGGACTGTGGAACCAACG VpPirA_R: GCACCCCAATTGGTATTGAATG	PirAvp	135	Han & ctv., 2015c
	Probe: AGACAGCAAAACATACACCTATCATCCCGCA toxR-F: AATCCATGGATTCCACGCGTTATTT toxR-R: CACCAATCTGACGGAACTGAGATTTC	ToxR	103	Han & ctv., 2015a
5-plex PCR	tetB-F: TTGCGGGGAATTGGCCCTATCAATT tetB-R: GTTGAGACGCAATCGAATTCCGGTAT	tetB	103	Han & ctv., 2015b
	16S-rRNA-F: CCGGGTAGTCCACGCCGTAA 16S-rRNA-R: CGAATTAAACCATATGCTCCA	16S-rRNA	168	Wei & ctv., 2014
	MV28-TLF: GTTCACACTCGGTGACAGCTTG MV28-TLR: AGTTTTCGGTAGGTTAAGTAC	tlh	248	Micky & ctv., 2014

qua các vùng khác của que nhờ lực mao dẫn của vùng dẫn mẫu. Vùng cộng hợp là nơi chứa các kháng thể và để phục vụ cho việc quan sát kết quả các kháng thể này thường được đánh dấu bằng các loại hạt như hạt keo vàng, hạt nhựa, hạt sắt,...; vùng cộng hợp cũng là nơi diễn ra phản ứng giữa kháng thể với kháng nguyên có trong mẫu, kháng nguyên sẽ được bắt giữ và tạo thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể đánh dấu. Phức hợp kháng nguyên-kháng thể đánh dấu sẽ được dẫn đến vùng kiểm tra, đây là nơi được cố định kháng thể đặc hiệu kháng nguyên. Tại đây kháng nguyên một lần nữa được bắt giữ và tạo thành phức hợp kháng thể-kháng nguyên-kháng thể đánh dấu, nhờ việc đánh dấu kháng thể bằng các vật liệu có thể quan sát trực tiếp nên kết quả của que thử miễn dịch được quan sát bằng mắt thường mà không cần thông qua các thiết bị đọc; vùng kiểm tra còn bao gồm một vạch đối chứng, nhằm đảm bảo que thử hoạt động một cách bình thường (Koczula & ctv., 2016).



Hình 3. Cấu trúc của que thử miễn dịch.

Ở phương pháp này, mẫu thử chứa kháng nguyên sẽ được kiểm tra bằng cách nhỏ trực tiếp vào vùng nạp mẫu của que thử và kết quả có thể quan sát trực tiếp chỉ sau 15 đến 20 phút vạch tín hiệu ở vùng kiểm tra. Với thao tác thực hiện đơn giản, que thử miễn dịch cho thấy sự tiện lợi của mình nên bất cứ ai cũng có thể tiến hành đánh giá mẫu thử. Với kích thước nhỏ gọn và quan sát kết quả trực quan, que thử có thể được sử dụng để phân tích mẫu thử ngay tại thực địa, đây là ưu điểm lớn nhất mà que thử mang lại trong phát hiện AHPND. Tuy nhiên, cho đến hiện nay vẫn chưa có sản phẩm que thử phát hiện AHPND được thương mại ở Việt Nam và trên thế giới.

Ở bệnh hoại tử gan tụy cấp, các nghiên cứu chỉ ra rằng, khi có sự hiện diện của hai độc tố ToxA và ToxB, tôm sẽ có các triệu chứng của AHPND

Bảng 5. Các phương pháp PCR khuếch đại toxA, toxB				
Tên phương pháp	Cặp mồi (5'-3')	Gen mục tiêu	Kích thước (bp)	Tác giả
5-plex PCR	PirAvp-F1: ACGGAGGCGGTCACAGAAGTA PirAvp-R1: CCAGCCGCCAGCCATAAAT	PirAvp	140	Devadas & ctv., 2019
	VpPirB-392F: TGATGAAGTGATGGGTGCTC VpPirB-392R: TGTAAGCGCCGTTAACTCA	PirBvp	392	Han & ctv., 2015a
	GMIF1-F: TTCTCAGCATTTGGACTGTCG GMIF2-R: GGGTAAATTCCGTCAAAGATG	toxA và toxB	366 (AHPND) 1429 (mutant-AHPND)	toxA và toxB
	Monoplex PCR			

và chết. Do đó, việc phát hiện hai độc tố ToxA và ToxB trong mẫu sẽ giúp phát hiện được tôm có nhiễm AHPND hay không, vì vậy hai độc tố ToxA và ToxB là kháng nguyên mục tiêu phát hiện trong phương pháp que thử miễn dịch. Hiện nay đã có các nghiên cứu gây đáp ứng miễn dịch và tạo thành công hai loại kháng thể đa dòng kháng ToxA và ToxB có độ đặc hiệu cao, không phản ứng chéo, không gây dương tính giả với các mẫu vi sinh vật thường gặp ở tôm nuôi. Kháng thể đa dòng có khả năng phát hiện nhiều chủng thu nhận từ các tỉnh khác nhau ở vùng Tây Nam Bộ và có ngưỡng phát hiện thấp (Duong & ctv., 2021; Nguyen-Phuoc & ctv., 2021). Từ đó, chúng tôi nghiên cứu và phát triển que thử phát hiện nhanh AHPND trên tôm đầu tiên ở Việt Nam, và que thử này có thể sử dụng ngay tại thực địa cho việc chẩn đoán nhanh bệnh này với độ đặc hiệu chẩn đoán 92,7%, độ nhạy chẩn đoán 95,7%, và giới hạn phát hiện đạt mức 15 ng/mL mỗi độc tố ToxA và ToxB (kết quả chưa công bố).

4. Phương pháp sử dụng cảm biến sinh học

Cảm biến sinh học mới được phát triển gần đây và được coi là công cụ tiềm năng để chẩn đoán bệnh. Cảm biến sinh học chẩn đoán định lượng bằng cách tạo ra tín hiệu tỷ lệ thuận với mầm bệnh, enzyme, tế bào hoặc độc tố được phân tích (Oluwaseun & ctv., 2018). Việc phát hiện bằng cảm biến sinh học có thể được dựa trên các phản ứng hóa học, các tín hiệu điện hoặc quang học được tạo ra thông qua sự tương tác của các thành phần protein hoặc axit nucleic. Việc phát hiện các protein liên quan đến bệnh đòi hỏi phải chính xác, nhạy và hiệu quả về mặt chi phí. Cảm biến sinh học gồm ba bộ phận chính: đầu thu sinh học có tác dụng phát hiện sự có mặt của các tác nhân sinh học cần phân tích, tác nhân cố định giúp gắn các đầu thu lên trên điện cực; bộ phận chuyển đổi tín hiệu giúp chuyển các biến đổi sinh học thành các tín hiệu có thể đo đạc được; bộ phận xử lý giúp đọc tín hiệu ra giúp chuyển các tín hiệu không điện thành các tín hiệu điện có thể xử lý. Một cảm biến miễn dịch điện hóa sử dụng graphene oxit cố định xanh methylene đã được sử dụng để phát hiện WSSV trong các mẫu tôm và cua (Natarajan & ctv., 2017). Cho đến hiện tại, chưa có bộ cảm biến sinh học nào được thiết lập để phát hiện AHPND. Cảm biến sinh học dựa trên DNA cho thấy đây là một công cụ đầy hứa hẹn trong việc chẩn đoán AHPND (Santos & ctv., 2020).

5. Kết Luận

Kể từ lần xuất hiện đầu tiên tại Trung Quốc năm 2009, bệnh Hoại tử gan tụy cấp đã lan nhanh khắp thế giới và gây ra thiệt hại về kinh tế vô cùng nặng nề. Các phương pháp chẩn đoán nhanh và sớm đang được tập trung nghiên cứu và phát triển tùy vào mục đích và đối tượng sử dụng. Phương pháp phát hiện dựa trên DNA (gen *tox*A và *tox*B) bao gồm multiplex PCR, nested PCR, real-time PCR và phương pháp ELISA đã được sử dụng để chẩn đoán AHPND. Ngoài ra, phương pháp monoplex dựa trên cặp mồi GMIF1-2 mới nhất hiện nay đã được chứng minh là phát hiện đồng thời AHPND và mutant-AHPND trên tôm. PCR được coi là chuẩn vàng, nhanh và chính xác, phù hợp cho các cơ quan địa phương trong công tác công bố dịch và xử lý cải tạo ao nuôi. Tuy nhiên, phương pháp này đòi hỏi thiết bị phức tạp như máy PCR và bộ điện di nên chỉ thích hợp thực hiện trong phòng thí nghiệm. Vì thế, phương pháp sử dụng que thử miễn dịch được phát triển để có thể chẩn đoán nhanh chóng ngay tại thực địa giúp nông dân chủ động hơn trong việc phòng tránh và điều trị kịp thời bệnh, góp phần hiệu quả vào sự phát triển kinh tế của hộ nông dân cũng như địa phương sở tại. Cuối cùng, phương pháp sử dụng cảm biến sinh học có nhiều ưu điểm so với các phương pháp truyền thống như tính chọn lọc cao, đáp ứng nhanh, đơn giản và chính xác mang đến nhiều tiềm năng trong chẩn đoán nhanh AHPND.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn nào giữa các tác giả.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Crowther, J. R. (1995). *ELISA: theory and practice*. Retrieved July 8, 2021, from <https://doi.org/text>.
- Cruz-Flores, R., Mai, H. N., & Dhar, A. K. (2019). Multiplex SYBR green and duplex TaqMan real-time PCR assays for the detection of photorhabdus insect-related (Pir) toxin genes *pirA* and *pirB*. *Molecular and Cellular Probes* 43, 20-28.
- Dangtip, S., Sirikharin, R., Sanguanrut, P., Thitamadee, S., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P., & Flegel, T. W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture Reports* 2, 158-162.

- Devadas, S., Bhassu, S., Soo, T. C. C., Yusoff, F. M., & Shariff, M. (2019). A new 5-plex PCR detection method for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND)-causing *Vibrio parahaemolyticus* strains. *Aquaculture* 503, 373–380.
- Duong, N. D., Nguyen-Phuoc, K. H., Do, K. Y. T., Nguyen, N. T. T., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2021). Production of Polyclonal Antibody against the Recombinant PirBvp protein of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* 19(1), 1-8.
- Flegel, T. W., & Lo, C. F. (2014). Free release of primers for specific detection of bacterial isolates that cause acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific (Bangkok). GOAL (Global Aquaculture Alliance). (2019). *Global shrimp production review*. Retrieved July 8, 2021, from <https://www.aquaculturealliance.org/advocate/goal-2019-global-shrimp-production-review/>.
- Han, J. E., Tang, K. F., Pantoja, C. R., White, B. L., & Lightner, D. V. (2015). qPCR assay for detecting and quantifying a virulence plasmid in acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) due to pathogenic *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture* 442, 12-15.
- Han, J. E., Tang, K. F., Tran, L. H., & Lightner, D. V. (2015a). Photorehabdus insect-related (Pir) toxin-like genes in a plasmid of *Vibrio parahaemolyticus*, the causative agent of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) of shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms* 113(1), 33-40.
- Han, J. E., Mohny, L. L., Tang, K. F., Pantoja, C. R., & Lightner, D. V. (2015b). Plasmid mediated tetracycline resistance of *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimps. *Aquaculture Reports* 2, 17-21.
- Koczula, K. M., & Gallotta, A. (2016) Lateral flow assays. *Essays in Biochemistry* 60(1), 111-120.
- Lua, Đ. T., Khue, N. V., & Van, P. T. (2016). Non-*Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis on brackish shrimps. *Vietnam Journal of Agricultural Sciences* 14(5), 690-698.
- Mai, H. N., Cruz-Flores, R., & Dhar, A. K. (2020). Development of an indirect enzyme linked immunoassay (iELISA) using monoclonal antibodies against photorehabdus insect related toxins, PirAVp and PirBVp released from *Vibrio* spp. *Journal of Microbiological Methods* 176, 106002.
- Mai-Hoang, T. D., Tien, H. L., Chau-Hoang, H. M., Nguyen-Phuoc, K. H., Pham, H. Q., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2021). A novel PCR method for simultaneously detecting acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) and mutant-AHPND in shrimp. *Aquaculture* 534, 736336.
- MARD (Ministry of Agriculture and Rural Development). (2016). Decision No. 04/2016/TT-BNNPTNT dated on May 10, 2016. Circular on prevention and control of aquatic animal diseases. Retrieved July 8, 2021, from <http://www.cucthuy.gov.vn/vanban/Pages/thong-tu-04.aspx>.
- MARD (Ministry of Agriculture and Rural Development). (2015). Report No. 5528/QĐ-BNN-TCTS dated on December 31, 2015. Master plan on brackish water shrimp farming in the Mekong Delta until 2020, vision to 2030. Retrieved August 1, 2021, from https://tongcucthuy.gov.vn/Portals/0/BAO%20CAO%20TOM%20NUOC%20LO_1.pdf.
- Micky, V., Nur Quraitu'Aini, T., Velnetti, L., Rowena, P., Christy, C., & Lesley Maurice, B. (2014). Development of a SYBR green based real-time polymerase chain reaction assay for specific detection and quantification of *Vibrio parahaemolyticus* from food and environmental samples. *International Food Research Journal* 21(3), 921-927.
- Natarajan, A., Devi, K. S., Raja, S., & Kumar, A. S. (2017). An elegant analysis of white spot syndrome virus using a graphene oxide/methylene blue based electrochemical immunosensor platform. *Scientific Reports* 7, 46169.
- Nguyen-Phuoc, K. H., Duong, N. D., Van Phan, T., Do, K. Y. T., Nguyen, N. T. T., Tran, T. L., & Tran-Van, H. (2021). Generation and evaluation of polyclonal antibodies specific for ToxA from *Vibrio parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) in shrimp. *Molecular Biology Research Communications* 10(1), 23-32.
- Oluwaseun, A. C., Phazang, P., & Sarin, N. B. (2018). Biosensors: a fast-growing technology for pathogen detection in agriculture and food sector. In Rinken, T., & Kivirans, K. (Eds.). *Biosensing technologies for the detection of pathogens-a prospective way for rapid analysis* (1st ed.). London, UK: IntechOpen Limited.
- Phisaisaiya, K., Charoensapsri, W., Taengphu, S., Dong, H. T., Sangsuriya, P., Nguyen, G. T. T., Pham, H. Q., Amparyup, P., Sritunyalucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Chaivisuthangkura, P., Longyant, S., Sithigorngul, P., & Senapin, S. (2017). A Natural *Vibrio parahaemolyticus* δ pirAVp pirBVp+ mutant kills shrimp but produces neither PirVp toxins nor acute hepatopancreatic necrosis disease lesions. *Applied and Environmental Microbiology* 83(16), e00680-17.
- Santos, H. M., Tsai, C. Y., Maquiling, K., Tayo, L. L., Mariatulqabiah, A. R., Lee, C. W., & Chuang, K. P. (2020). Diagnosis and potential treatments for acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND): a review. *Aquaculture international: Journal of the European Aquaculture Society* 28, 169-185.
- Sirikharin, R., Taengchaiyaphum, S., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S., Flegel, T. W., Mavichak, R., & Proespraiwong, P. (2014). *A new and improved PCR method for detection of AHPND bacteria*. Network of Aquaculture Centres in Asia and the Pacific, Bangkok, Thailand.
- VASEP (Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers). (2019). *Shrimp industry overview*. Retrieved June 14, 2021, from <http://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/tom/tong-quan-nganh-tom>.

- VASEP (Vietnam Association of Seafood Exporters and Producers). (2018). *Vietnam shrimp exports: 20 years in retrospect*. Retrived June 14, 2021, from <http://vasep.com.vn/san-pham-xuat-khau/tom/xuat-nhap-khau/xuat-khau-tom-viet-nam-20-nam-nhin-lai-6287.html>.
- Wei, S., Zhao, H., Xian, Y., Hussain, M. A., & Wu, X. (2014). Multiplex PCR assays for the detection of *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio cholerae* with an internal amplification control. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 79(2), 115-118.
- Xiao, J., Liu, L., Ke, Y., Li, X., Liu, Y., Pan, Y., Yan, S., & Wang, Y., (2017). Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports* 7, 42177.

Assessment of the immune responses of macrophages in selective breeding pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*) resistant to enteric septicemia of catfish (ESC)

Dung T. P. Tran^{1,3*}, Sang V. Nguyen², Phuong H. Vo², Phuc H. Tran²,
Quan T. T. Huynh³, & Thinh H. Nguyen³

¹Faculty of Biology, Ho Chi Minh City University of Education, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Research Institute for Aquaculture No. 2, Ho Chi Minh City, Vietnam

³Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: July 09, 2021

Revised: August 23, 2021

Accepted: August 30, 2021

Keywords

Edwardsiella ictaluri

Enteric Septicemia of Catfish (ESC) resistance

Melano-macrophages

Pangasius

*Corresponding author

Tran Thi Phuong Dung

Email: dungttp@hcmue.edu.vn

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the non-specific immune responses of macrophages in two selective breeding pangasius family groups: high disease-resistant (A) and low disease-resistant (B) to Enteric Septicemia of Catfish (ESC) caused by *Edwardsiella ictaluri*. Fish were sampled at five different time points after infection with the bacteria *E. ictaluri* including before the infection process, 24 hpi, 48 hpi, 264 hpi and 312 hpi. There were 372 samples including 192 samples of fish in group A and 180 samples in group B. All of them were used to analyze the amount of melano-macrophage centers in the tissues of liver, kidney and spleen; phagocytosis activity (PA) and phagocytosis index (PI) of the anterior kidney macrophages. Results showed that (1) the number of melano-macrophages of group A fish was higher than that of group B at survey points during the challenge and the difference was significant at 48 hpi; (2) PA and PI of group A were higher than those of group B in the period from 48 to 264 hpi, specifically, the PI of group A was higher than that of group B, which was statistically significant at 48 hpi. The results of this study showed that the differences in non-specific immune responses through melano-macrophages can improve the survival rate and life span of the high disease-resistant family compared to the low disease-resistant family after the challenge with *Edwardsiella ictaluri*.

Cited as: Tran, D. T. P., Nguyen, S. V., Vo, P. H., Tran, P. H., Huynh, Q. T. T., & Nguyen, T. H. (2021). Assessment of the immune responses of macrophages in selective breeding pangasius families (*Pangasianodon hypophthalmus*) resistant to enteric septicemia of catfish (ESC). *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 28-38.

Đánh giá đáp ứng miễn dịch của đại thực bào trong các gia đình cá tra chọn giống (*Pangasianodon hypophthalmus*) kháng bệnh gan thận mủ

Trần Thị Phương Dung^{1,3*}, Nguyễn Văn Sáng², Võ Hồng Phương², Trần Hữu Phúc²,
Huỳnh Thị Trúc Quân³ & Nguyễn Hữu Thịnh³

¹Khoa Sinh Học, Trường Đại Học Sư Phạm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

²Viện Nghiên Cứu Nuôi Trồng Thủy Sản II, TP. Hồ Chí Minh

³Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 09/07/2021

Ngày chỉnh sửa: 23/08/2021

Ngày chấp nhận: 30/08/2021

Từ khóa

Cá tra

Đại thực bào

Edwardsiella ictaluri

Kháng bệnh gan thận mủ

*Tác giả liên hệ

Trần Thị Phương Dung

Email: dungttp@hcmue.edu.vn

TÓM TẮT

Đáp ứng miễn dịch không đặc của đại thực bào của hai nhóm gia đình cá tra chọn giống kháng bệnh gan thận mủ do *Edwardsiella ictaluri* cao (A) và thấp (B) được đánh giá trong nghiên cứu này. Cá được thu mẫu tại năm thời điểm sau cảm nhiễm với *Edwardsiella ictaluri* gồm ngay trước cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 giờ sau cảm nhiễm (hpi). Tổng số mẫu phân tích số lượng trung tâm đại thực bào tại mô gan, thận và lách, hoạt lực và chỉ số thực bào của đại thực bào của thận trước là 372 bao gồm 192 mẫu của cá thuộc nhóm A và 180 mẫu thuộc nhóm B. Kết quả cho thấy: (1) số lượng trung tâm đại thực bào của cá nhóm A cao hơn nhóm B qua các giai đoạn cảm nhiễm và sự khác biệt có ý nghĩa tại 48 hpi; (2) hoạt lực thực bào PA và chỉ số thực bào PI của cá nhóm A cao hơn nhóm B từ giai đoạn 48 đến 264 hpi, riêng chỉ số thực bào PI nhóm A cao hơn nhóm B có ý nghĩa thống kê tại thời điểm 48 hpi. Các kết quả của nghiên cứu này cho thấy sự khác biệt về đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu thông qua đại thực bào đã giúp nâng cao tỉ lệ sống và thời gian sống của gia đình kháng bệnh cao so với các gia đình kháng bệnh thấp sau khi cảm nhiễm với *Edwardsiella ictaluri*.

1. Đặt Vấn Đề

Cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) là loài cá nuôi nước ngọt quan trọng (Phan & ctv., 2009), chiếm đến 52% tổng sản lượng thủy sản xuất khẩu của Việt Nam. Cá tra được Thủ tướng Chính phủ phê duyệt tại Quyết định số 439/QĐ-TTg là đối tượng chủ lực chỉ sau cây lúa để tái cơ cấu nền nông nghiệp của Việt Nam (LDSC, 2019). Trong năm 2019, các sản phẩm từ cá tra đã được xuất khẩu đến 127 quốc gia trên thế giới và đạt kim ngạch hơn 1,9 tỉ USD (DOF, 2020). Tuy nhiên, một trong những khó khăn của nghề nuôi cá tra hiện nay là thiệt hại do dịch bệnh gan thận mủ (GTM). Bệnh xuất hiện hầu như ở mọi kích cỡ cá nhưng nhiều nhất ở cá nuôi dưới 4 tháng tuổi (Ly, 2008). Các phương pháp phòng và trị bệnh có thể hiệu quả hơn trên cơ sở khả năng kháng bệnh tự nhiên ở cá được cải thiện. Hiện

nay có nhiều phương pháp phòng và trị bệnh do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* (*E. ictaluri*) như sử dụng kháng sinh để chữa bệnh cho cá bị nhiễm vi khuẩn, tăng sức đề kháng cho cá tra thông qua bổ sung chất kích thích miễn dịch vào thức ăn. Tuy nhiên, việc sử dụng nhiều kháng sinh trong nghề nuôi thủy sản ở Việt Nam đã và đang làm tăng chi phí sản xuất, giảm khả năng cạnh tranh ở những thị trường nhập khẩu khó tính và ảnh hưởng tới vấn đề quan tâm toàn cầu là an toàn vệ sinh thực phẩm. Tăng sức đề kháng cho cá bằng chất kích thích miễn dịch phải tiến hành lâu dài và mang lại hiệu quả chưa cao. Do đó, chọn giống kháng bệnh vẫn là giải pháp tối ưu cho hướng phát triển bền vững các đối tượng cá nuôi. Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II đã chọn lọc và thành lập quần thể cá tra bố mẹ G0 kháng bệnh GTM có hiệu quả chọn lọc kháng bệnh ước tính là 8,3% (Trình & ctv., 2016). Từ

đó, thể hệ G1 đã được tiếp tục chọn lọc cho mục tiêu sản xuất cá tra kháng bệnh.

Chọn giống kháng bệnh có thể cải thiện được khả năng đáp ứng miễn dịch qua các kết quả trong nghiên cứu của Camp & ctv. (2000). Nghiên cứu này cho thấy số lượng trung tâm đại thực bào, tế bào lympho T có sự khác biệt giữa hai nhóm gia đình chọn giống miễn cảm và kháng bệnh trên cá nhéo Mỹ (*Ictalurus punctatus*) trong quá trình cảm nhiễm *E. ictaluri*. Trong đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, khả năng thực bào của đại thực bào được đánh giá cao hơn rất nhiều so với bạch cầu trung tính hay bạch cầu đơn nhân. Đại thực bào có khả năng thực bào tế bào đã chết, mô hoại tử, vi khuẩn và ký sinh trùng (Shoemaker & ctv., 1997; Ferguson, 2006; Jeney, 2017). Tran & ctv. (2020) đã công bố về hệ số di truyền tính trạng kháng bệnh GTM ở quần thể cá tra chọn giống thể hệ thứ nhất (G1) trong quá trình cảm nhiễm đối với *E. ictaluri*. Tuy nhiên, sự khác biệt trong cơ chế miễn dịch không đặc hiệu thể hiện qua số lượng và khả năng thực bào của các đại thực bào giữa các gia đình cá tra kháng bệnh cao và thấp chưa được đề cập. Nghiên cứu này có mục đích làm sáng tỏ sự khác biệt về đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu thông qua so sánh về số lượng trung tâm đại thực bào và khả năng thực bào của hai nhóm gia đình cá tra chọn giống G1 kháng bệnh GTM.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Cá và chủng vi khuẩn thí nghiệm

Cá tra bố mẹ là quần thể ban đầu cho chọn giống kháng bệnh gan thận mủ G0 được thành lập trong đề tài nghiên cứu giai đoạn 2012 – 2015 tại Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II với hệ số di truyền và hiệu quả chọn lọc ước tính là 0,37 và 8,3%. Cá hương và cá giống quần thể thể G1 (trọng lượng trung bình theo thứ tự $0,16 \pm 0,10$ và $21,17 \pm 8,39$ g/con) được sử dụng trong nghiên cứu này.

Chủng vi khuẩn dùng cho các thí nghiệm cảm nhiễm là *E. ictaluri* Gly09M phân lập từ cá tra bệnh GTM nuôi tại An Giang năm 2009. Độc lực của chủng vi khuẩn được hồi phục bằng cách gây nhiễm và tái phân lập từ cá tra khỏe mạnh ba lần trước khi sử dụng cho thí nghiệm. Vi khuẩn gây cảm nhiễm được phục hồi trên môi trường thạch máu cừu ở trong tủ ẩm 48 giờ ở 28°C, sau đó chọn một đến hai khuẩn lạc nuôi tăng sinh trong môi trường BHIB (BHI Broth), lắc 85 rpm

trong 24 giờ. Xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ DNA SmartSpec Plus ở bước sóng 550 nm ($OD = 1$ tương ứng với mật độ vi khuẩn là $1,2 \times 10^9$ CFU/mL) kết hợp với phương pháp đếm số khuẩn lạc phát triển trên môi trường TSA (CFU/mL).

2.2. Ước tính giá trị chọn giống của cá G1 nhằm xác định nhóm gia đình cá kháng bệnh cao và thấp

2.2.1. Thí nghiệm cảm nhiễm cá hương và cá giống G1

Cá hương: 1.650 cá thuộc 33 gia đình cá hương được gây nhiễm *E. ictaluri* bằng phương pháp ngâm đến hết thời gian thí nghiệm, phù hợp với các kích thước nhỏ (Jeney, 2017). Cá trong từng gia đình được cảm nhiễm trong bể riêng 30 L với 50 cá/bể (mật độ cá trong bể là 1 cá/0,4 lít nước) và nhiệt độ nước 26 - 28°C. Liều gây nhiễm 10^5 CFU/mL từ thí nghiệm thăm dò. Các chỉ tiêu pH, NH_3 , nhiệt, oxi hòa tan trong nước được kiểm tra 24 giờ một lần vào lúc 7 giờ sáng. Ghi nhận biểu hiện lâm sàng, bệnh tích, số lượng cá chết 3 giờ/lần trong suốt 504 giờ sau khi gây nhiễm.

Cá giống: 1.361 cá (đã được đánh dấu PIT) thuộc 33 gia đình cá giống được gây nhiễm theo phương pháp của Trinh & ctv. (2016). Tất cả cá thí nghiệm được nuôi trong cùng một bể lót bạt có sục khí, diện tích mỗi bể là 16 m² với mật độ 1 cá/3,9 lít nước và nhiệt độ 26 - 28°C. Cá thí nghiệm được nuôi chung với cá đã được gây nhiễm với vi khuẩn *E. ictaluri* bằng phương pháp tiêm xoang bụng với liều 2×10^5 CFU/cá. Tỷ lệ cá thí nghiệm: cá được gây nhiễm trong bể là 65% và 35% từ thí nghiệm thăm dò. Ngày thứ hai sau khi nuôi chung cá thí nghiệm và cá nhiễm bệnh GTM, vi khuẩn *E. ictaluri* được cho vào nước 1 lần duy nhất để bể thí nghiệm đạt mật độ 10^5 CFU/mL. Thí nghiệm không thay nước và không cho cá ăn. Việc quản lý chất lượng nước và ghi nhận biểu hiện bệnh, số lượng cá chết được thực hiện tương tự như trong thí nghiệm với cá hương.

2.2.2. Ước tính giá trị chọn giống của cá G1

Tính trạng kháng bệnh cao và thấp (biến nhị phân) của các cá thể trong thí nghiệm cảm nhiễm được mã hóa: cá thể thuộc gia đình kháng bệnh cao là 1 và thuộc gia đình kháng bệnh thấp là 0. Dựa vào tình trạng sống/chết của các cá thể trong mỗi gia đình, thông tin phả hệ G0, nghiên cứu

này sử dụng mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể tính toán giá trị chọn giống ước tính (Estimated breeding value - EBV) của từng gia đình. Mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể ước tính giá trị chọn giống của các gia đình cá hương và cá giống được thực hiện bằng phần mềm ASReml v3 (Gilmour & ctv., 2014). Giá trị chọn giống của các gia đình cá được ước tính tại giai đoạn tổng số cá sống còn 50% trong giai đoạn cảm nhiễm (Gjøen & ctv., 1997).

Đối với cá hương: Mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể được dùng để ước tính các thành phần phương sai (bao gồm σ_A^2 = phương sai di truyền cộng gộp, σ_E^2 là phương sai số dư và phương sai kiểu hình $\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_E^2$ là: $y_{ij} = \mu + \beta_1 \times \text{tuổi cảm nhiễm}_i + \text{cá thể}_j + e_{ij}$. Trong đó: y_{ij} là tình trạng (sống hoặc chết) của cá thể j khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm, μ là trung bình tỉ lệ sống của quần thể cá thí nghiệm, β_1 là hệ số hồi quy của hiệp biến “tuổi cảm nhiễm = 27 ngày”, cá thể j là ảnh hưởng ngẫu nhiên của cá thể j và e_{ij} là ảnh hưởng của số dư.

Đối với cá giống: Mô hình tuyến tính hỗn hợp cá thể được dùng để ước tính các thành phần phương sai (bao gồm σ_A^2 = phương sai di truyền cộng gộp, σ_E^2 là phương sai số dư và phương sai kiểu hình $\sigma_P^2 = \sigma_A^2 + \sigma_E^2$ là: $y_{ijk} = \mu + \beta_1 \times \text{tuổi đánh dấu}_i + \text{bể}_j + \text{cá thể}_k + e_{ijk}$. Trong đó: y_{ijk} là tình trạng (sống hoặc chết) của cá thể k khi kết thúc thí nghiệm cảm nhiễm, μ là trung bình tỉ lệ sống của quần thể cá thí nghiệm, β_1 là hệ số hồi quy của hiệp biến “tuổi đánh dấu (từ 145 - 209 ngày tùy gia đình)”, bể j là ảnh hưởng cố định hai bể thí nghiệm (bể 1 hoặc bể 2), cá thể k là ảnh hưởng ngẫu nhiên của cá thể k và e_{ijk} là ảnh hưởng của số dư.

Đường biểu diễn Kaplan-Meier thể hiện nguy cơ tử vong giữa hai nhóm cá kháng bệnh cao và thấp (Trinh & ctv., 2016) được thực hiện bằng phần mềm STATA v.14.0.

2.3. Thí nghiệm cảm nhiễm hai nhóm gia đình cá kháng bệnh đánh giá khả năng thực bào của đại thực bào

2.3.1. Thí nghiệm cảm nhiễm trên 6 gia đình cá giống G1

Sáu gia đình cá giống G1 (3 gia đình có EBV cao và 3 gia đình có EBV thấp ở hai giai đoạn cá hương và cá giống) được cảm nhiễm *E. ictaluri* với cách thức cảm nhiễm tương tự như thí nghiệm cảm nhiễm trên cá giống được đề cập ở mục 2.2.1.

Mỗi gia đình 30 cá trong bể 90 L. Cá được thu mẫu để phân tích tại các thời điểm ngay trước khi cảm nhiễm, 24, 48, 264 và 312 giờ sau cảm nhiễm (hpi). Tổng số mẫu phân tích số lượng trung tâm đại thực bào, hoạt lực và chỉ số thực bào của đại thực bào là 372 bao gồm 192 mẫu của cá thuộc nhóm gia đình kháng bệnh cao và 180 mẫu cá thuộc nhóm gia đình kháng bệnh thấp.

2.3.2. Xác định số lượng trung tâm đại thực bào ở mô gan, thận, lách

Phương pháp xác định tổng số lượng trung tâm đại thực bào ở ba mô gan, thận, lách được tiến hành theo Camp & ctv. (2000) như sau: (1) nhuộm HE lát cắt mô; (2) quan sát mẫu trên kính hiển vi quang học với vật kính 40X tại 5 vùng thị kính (4 góc và chính giữa lát cắt mô); (3) tính số lượng trung tâm đại thực bào ở mỗi mô (gan; thận; lách) bằng tổng số lượng đại thực bào trong 5 vùng thị kính; (4) tính số lượng trung tâm đại thực bào ở mỗi mô gan, thận, lách; (5) Tổng trung tâm đại thực bào ở ba mô = trung tâm đại thực bào ở gan + trung tâm đại thực bào ở thận + trung tâm đại thực bào ở lách.

2.3.3. Khả năng thực bào của đại thực bào

Phương pháp xác định khả năng thực bào của đại thực bào được thực hiện theo Paredes & ctv. (2013) có hiệu chỉnh như sau: thu mẫu thận trước, nghiền nát thận trước và rửa qua dung dịch RPMI+Heparin. Sau đó hút dung dịch chứa đại thực bào cho vào vòng tròn được vẽ sẵn bằng bút pap có đường kính bằng chiều rộng lam kính. Ủ ấm 28°C trong 60 phút cho đại thực bào bám vào lam kính. Sau khi rửa nhẹ nhàng lame kính bằng dung dịch Hank, hút 150 μ L dung dịch chứa nấm men (đã được nhuộm bằng thuốc nhuộm congo red) nhỏ vào trong mỗi vòng. Ủ trong 2 giờ để hoạt động thực bào diễn ra. Rửa lame kính với dung dịch PBS (Phosphate Buffer Saline) gồm 13,8g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 17,82 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ và 8,5g/L NaCl trong 1 lít nước sao cho pH 7,2 sau đó cố định mẫu lần lượt bằng methanol 100% và 70%. Sau cùng nhuộm lam kính bằng thuốc nhuộm Giemsa. Quan sát dưới kính hiển vi vật kính 100X. Công thức tính hoạt lực thực bào theo Paredes & ctv. (2013) và chỉ số thực bào theo Park & ctv. (2020):

$$PA = \frac{\text{Số tế bào thực bào đã thực bào nấm men}}{\text{Số tế bào thực bào}} \times 100$$

Bảng 1. Chất lượng môi trường nước của bể thí nghiệm trong quá trình cảm nhiễm

STT	Chỉ tiêu	Cá hương	Cá giống
1	pH	7,56 ± 0,17	7,90 ± 0,83
2	NH ₃ (mg/L)	0,06 ± 0,03	0,80 ± 0,21
3	Oxy hòa tan (mg/L)	4,71 ± 0,48	4,08 ± 1,52
4	Nhiệt độ (°C)	26,08 ± 0,80	26,80 ± 1,60

Chất lượng môi trường nước về các chỉ tiêu như pH, NH₃, oxy hòa tan và nhiệt độ trong các bể thí nghiệm cảm nhiễm ở giai đoạn cá hương và cá giống đều được duy trì trong khoảng phát triển bình thường của cá tra.

$$PI = \frac{\text{Số tế bào nấm men đã bị thực bào}}{\text{Số tế bào thực bào nấm men}} \times \frac{PA}{100}$$

PA (Phagocytic activity, %): hoạt lực thực bào

PI (Phagocytic index, nấm men/tế bào đại thực bào): chỉ số thực bào

2.3.4. Xử lý số liệu

Kiểm định Logrank được dùng để chỉ ra khác biệt nguy cơ tử vong giữa hai nhóm cá kháng bệnh. Số liệu về khả năng thực bào của đại thực bào của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp tại mỗi thời điểm được kiểm tra xác suất của phân phối chuẩn bằng thử nghiệm Skewness và Kurtosis. Kiểm định trung bình t - test hai nhóm độc lập được sử dụng để so sánh giá trị trung bình của các biến tại mỗi thời điểm giữa hai nhóm gia đình. Phân tích sự khác biệt giữa hai nhóm gia đình kháng bệnh được thực hiện trên phần mềm SPSS v.20.0 với mức ý nghĩa được sử dụng để kiểm định sai khác có ý nghĩa là 0,05.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Ước tính giá trị chọn giống của cá G1 nhằm xác định nhóm gia đình cá kháng bệnh cao và thấp

3.1.1. Chất lượng môi trường nước trong quá trình cảm nhiễm

Chất lượng môi trường nước của bể thí nghiệm trong quá trình cảm nhiễm thể hiện ở Bảng 1.

3.1.2. Tỷ lệ chết của các gia đình cá chọn giống giai đoạn cá hương và cá giống

Qua Hình 1 cho thấy các gia đình cá hương bắt đầu chết vào 144 giờ (ngoại trừ gia đình số 1 chết từ giai đoạn 24 giờ) và chết nhiều nhất từ 168 - 264 giờ sau cảm nhiễm. Kết thúc thí nghiệm, tỷ lệ chết trung bình của 33 gia đình cá hương là 93%. Các gia đình cá giống bắt đầu chết vào 24 giờ và chết nhiều nhất từ 48 - 192 giờ sau

cảm nhiễm. Một số gia đình vẫn tiếp tục chết nhiều đến thời điểm 432 giờ sau cảm nhiễm. Kết thúc thí nghiệm, tỷ lệ chết trung bình của 33 gia đình cá giống là 100%. Thời gian sống trung bình trong quá trình thí nghiệm của 33 gia đình cá hương là 247,14 ± 50,62 giờ và của 33 gia đình cá giống là 137,62 ± 34,02 giờ.

3.1.3. Ước tính giá trị chọn giống của 33 gia đình cá hương và cá giống G1

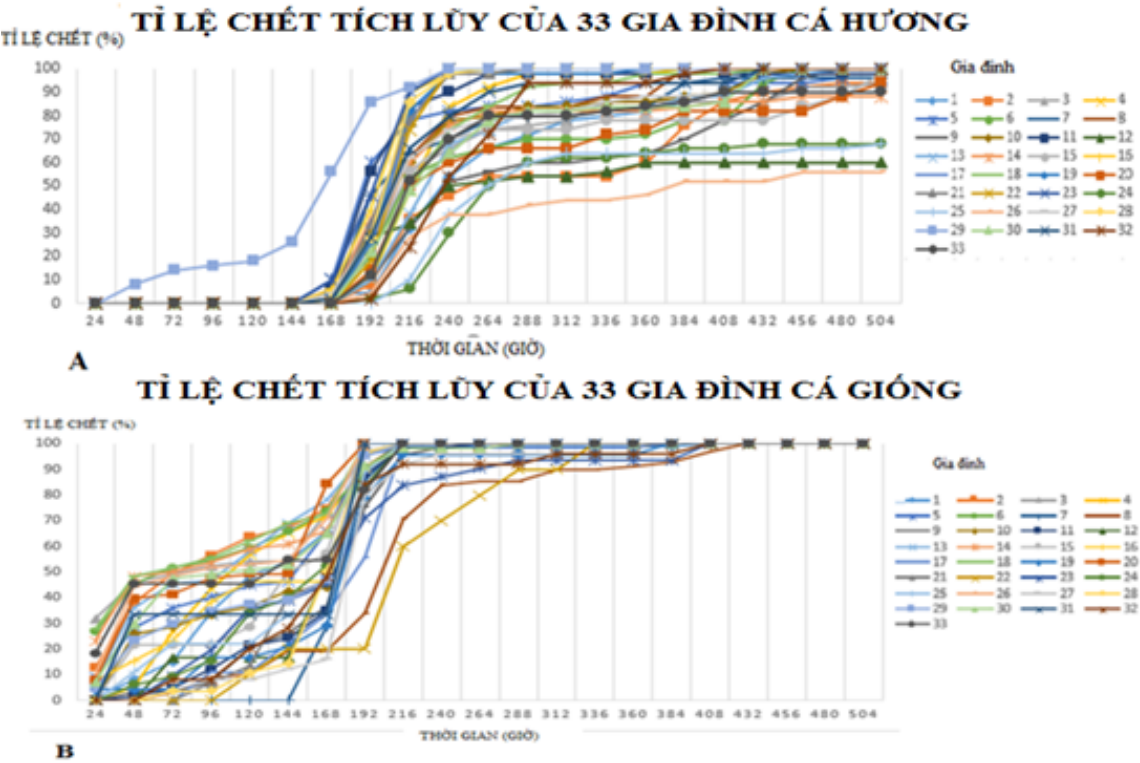
Kết quả ước tính EBV của 33 gia đình cá hương và cá giống được trình bày tại Bảng 2.

Theo nghiên cứu Gjøsøen & ctv. (1997), giai đoạn tỷ lệ cá chết 50% sau cảm nhiễm thường được lựa chọn để tính toán thông số di truyền vì một số ít gia đình không còn cá thể sống đến giai đoạn tỷ lệ chết 75% hay cuối thí nghiệm dẫn đến làm sai lệch kết quả trong việc ước tính thông số di truyền. Ngoài ra, giai đoạn chết 50% còn tối đa hóa phương sai kiểu hình tính trạng kháng bệnh (nhị phân) giúp việc ước tính chính xác hơn (Pham & ctv., 2020). Nghiên cứu của Trinh & ctv. (2019) cho thấy việc ước tính các thông số di truyền kháng bệnh trong giai đoạn đầu của quá trình cảm nhiễm sẽ cho kết quả khả quan hơn. Vì vậy, nghiên cứu này dựa vào giá trị chọn giống ước tính tại giai đoạn cắt ngang 50% tỷ lệ cá chết để xác định những gia đình kháng bệnh cao hay thấp. Kết quả dựa vào xếp hạng trung bình EBV của các gia đình tại hai giai đoạn chọn hai nhóm cá kháng bệnh cao và thấp (nhóm kháng bệnh cao: EBV các gia đình đều cao ở hai giai đoạn và chủ yếu là giai đoạn cá giống và nhóm kháng bệnh thấp tương tự EBV thấp ở hai giai đoạn). Trong 33 gia đình, nghiên cứu đã chọn được 3 gia đình kháng bệnh cao (giá trị EBV tại giai đoạn cá hương, cá giống lần lượt là 0,18, 0,03, -0,05; 0,07, 0,05, 0,06) và 3 gia đình kháng bệnh thấp (giá trị EBV tại giai đoạn cá hương, cá giống lần lượt là -0,24, -0,26, 0,04 và -0,05, 0,03, -0,03) để so sánh đáp ứng miễn dịch. Các gia đình này có thứ tự xếp hạng giá trị chọn giống ước tính sắp

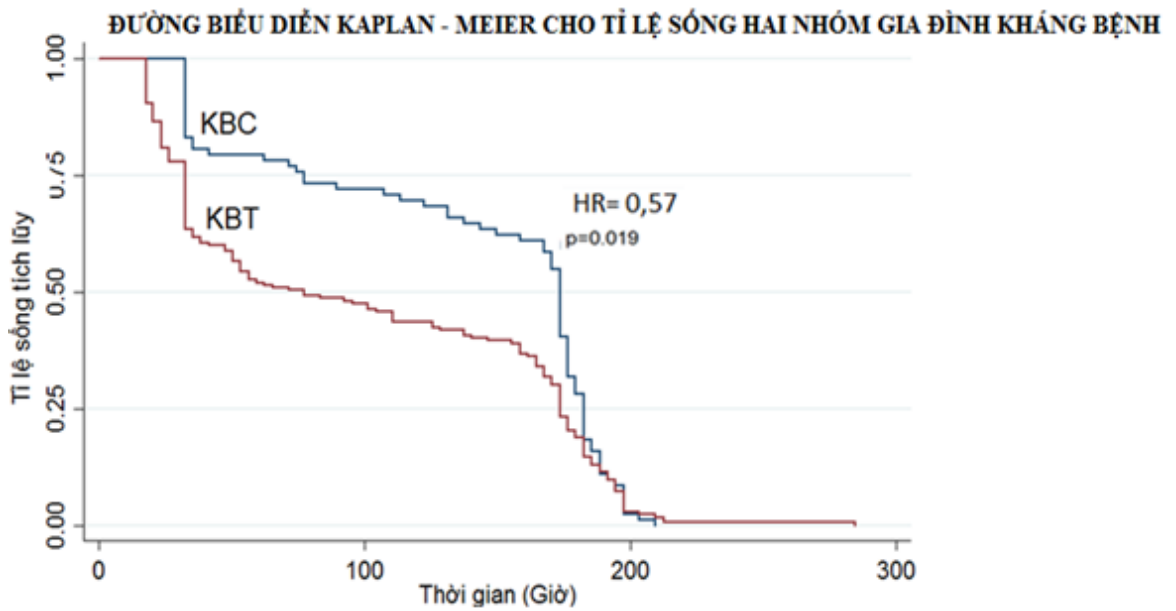
Bảng 2. Giá trị EBV trung bình của 33 gia đình cá hương và cá giống¹

STT*	Cá hương	Cá giống	Trung bình	STT*	Cá hương	Cá giống	Trung bình
1	-0,26	-0,05	-0,16	18	0,02	-0,05	-0,02
2	-0,09	-0,06	-0,08	19	-0,29	0,09	-0,10
3	-0,01	-0,03	-0,02	20	-0,11	-0,09	-0,10
4	-0,33	-0,12	-0,23	21	0,06	0,00	0,03
5	0,43	-0,06	0,19	22	-0,26	0,07	-0,09
6	-0,24	-0,05	-0,15	23	-0,09	0,02	-0,04
7	0,18	0,07	0,13	24	-0,10	-0,03	-0,07
8	0,25	0,07	0,16	25	0,45	0,05	0,25
9	0,05	0,03	0,04	26	0,28	-0,08	0,10
10	0,03	0,05	0,04	27	-0,09	0,10	0,01
11	0,24	0,08	0,16	28	-0,21	0,01	-0,10
12	-0,07	0,04	-0,02	29	-0,37	0,05	-0,16
13	0,08	-0,11	-0,02	30	0,04	-0,03	0,00
14	-0,26	0,03	-0,12	31	-0,12	0,03	-0,05
15	0,16	0,01	0,09	32	0,31	0,01	0,16
16	0,13	0,04	0,09	33	0,08	0,01	0,05
17	-0,05	0,06	0,01				

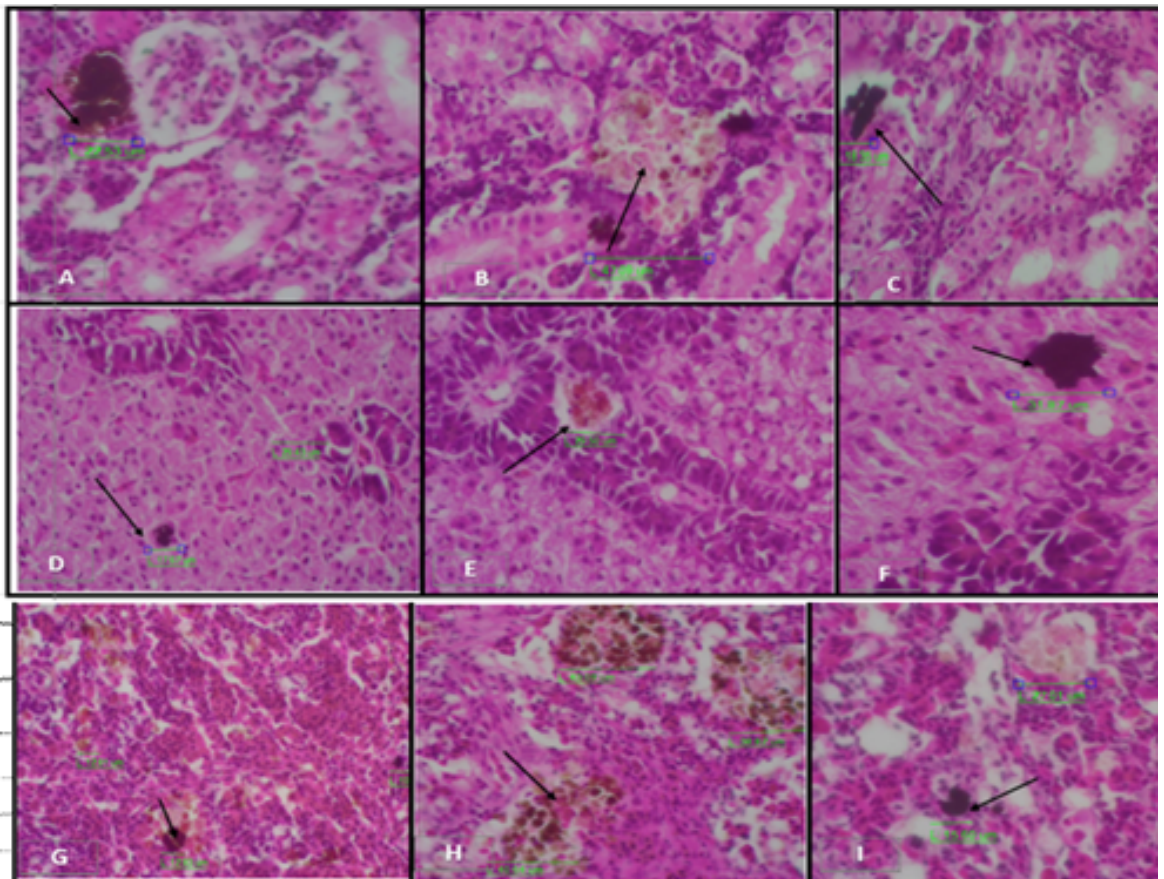
*: Số thứ tự các gia đình trong 33 gia đình cá chọn giống; ¹EBV: Estimated breeding value.



Hình 1. Tỷ lệ chết tích lũy (%) của cá hương (A) và cá giống (B) trong thí nghiệm cảm nhiễm.



Hình 2. Đường biểu diễn Kaplan-Meier cho tỉ lệ sống hai nhóm gia đình kháng bệnh.

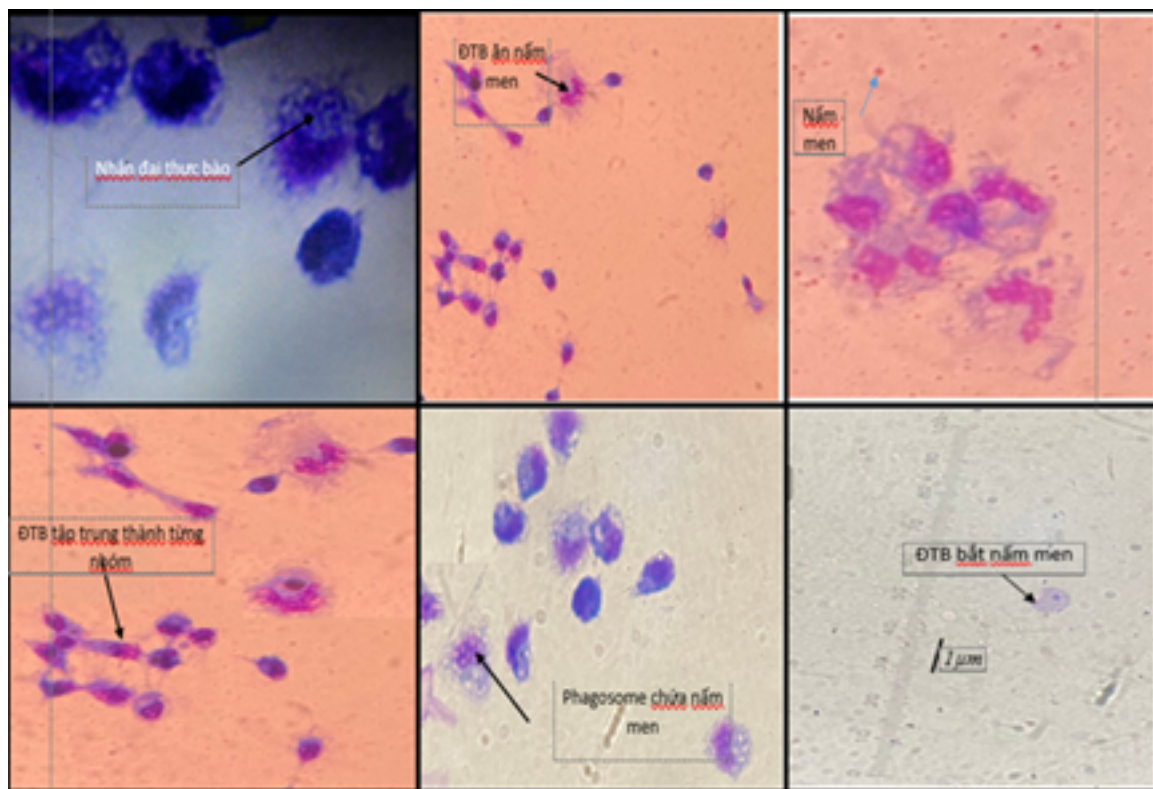


Hình 3. Trung tâm đại thực bào ở mô.

Bảng 3. Giá trị EBV của 6 gia đình kháng bệnh cao và thấp tại hai giai đoạn cá hương và cá giống

Gia đình	STT	Giá trị EBV ¹	Thứ tự EBV ¹	Giá trị EBV ²	Thứ tự EBV ²	EBV TB ^{1,2}	Thứ tự TB EBV ^{1,2}
Kháng bệnh cao	1	0,18	7	0,07	6	0,13	6,5
	2	0,03	15	0,05	9	0,04	12
	3	-0,05	18	0,06	7	0,01	12,5
	4	-0,24	27	-0,05	27	-0,15	27
Kháng bệnh thấp	5	-0,26	29	0,03	15	-0,12	22
	6	0,04	14	-0,03	22	0,00	18

¹: Giai đoạn cá hương; ²: Giai đoạn cá giống; TB: Trung bình; EBV: Estimated breeding value.
Thứ tự xếp hạng theo số thứ tự theo mức kháng bệnh từ cao đến thấp.

**Hình 4.** Đại thực bào nấm men dưới kính vi (100X, 40X, 20X).

xếp theo thứ tự được trình bày tại Bảng 3.

Trung bình thời gian sống trong quá trình cảm nhiễm của nhóm kháng bệnh cao là $153,47 \pm 79,49$ giờ và của nhóm kháng bệnh thấp là $99,95 \pm 72,35$ giờ. Sự khác biệt về thời gian sống hai nhóm kháng bệnh có ý nghĩa thống kê ($P = 0,00$). Tỷ lệ sống tích lũy đến khi kết thúc thí nghiệm của hai nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp đều là 0,0%. Tuy nhiên, qua đường biểu diễn Kaplan - Meier (Hình 2) cho thấy tỷ lệ sống tích lũy của các gia đình kháng bệnh thấp bằng 0,57 của các gia

đình kháng bệnh cao. Nguy cơ tử vong của nhóm kháng bệnh cao thấp hơn nhóm kháng bệnh thấp là khoảng 43% ($HR = 0,57$, $P = 0,019$). Kiểm định Logrank cho thấy sự khác biệt nguy cơ tử vong giữa hai nhóm cá kháng bệnh có ý nghĩa thống kê (giá trị $P = 0,013$). Tóm lại, qua quá trình cảm nhiễm các gia đình kháng bệnh cao có tỷ lệ sống và thời gian sống cao hơn so với các gia đình kháng bệnh thấp. Tuy nhiên, sự khác biệt tỷ lệ sống tích lũy của hai nhóm kháng bệnh cao và thấp chủ yếu thể hiện trong giai đoạn 24 - 200 hpi (Hình 2).

3.2. Khả năng thực bào của đại thực bào của cá thuộc các gia đình kháng bệnh cao và thấp

Trung tâm đại thực bào ở mô gan (A, B, C), thận (D, E, F), lách (G, H, I) và đại thực bào nằm men dưới kính hiển vi (100X, 40X, 20X) thể hiện ở Hình 3 và 4.

Sau khi vượt qua lớp hàng rào phòng vệ bên ngoài cơ thể cá như lớp chất nhầy và biểu mô che phủ mang và da, vi khuẩn sẽ bị thực bào bởi đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và tế bào giết tự nhiên (Frøystad & ctv, 1998; Evans & ctv, 2001). Sự biến động số lượng trung tâm đại thực bào và khả năng thực bào của đại thực bào trong quá trình cảm nhiễm của cá thuộc hai nhóm gia đình kháng bệnh được trình bày trong Bảng 4. Các kết quả này phản ánh chức năng diệt khuẩn của đại thực bào trong phản ứng viêm hệ thống và đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu (Shoemaker & ctv., 1997). Ngoài việc tăng số lượng trung tâm đại thực bào thì khả năng thực bào (hoạt lực thực bào và chỉ số thực bào) của các loại tế bào bạch cầu cũng đóng vai trò quan trọng trong việc đáp ứng miễn dịch của cá.

Số lượng trung tâm đại thực bào của nhóm kháng bệnh cao (A) tăng từ trước cảm nhiễm (18,79 trung tâm đại thực bào/mô) đến giai đoạn 48 hpi (47,46 trung tâm đại thực bào/mô) sau đó giảm đến giai đoạn 264 hpi (20,16 trung tâm đại thực bào/mô). Đối với nhóm khám bệnh thấp (B), số lượng trung tâm đại thực bào tăng từ trước cảm nhiễm (22,21 trung tâm đại thực bào/mô) đến giai đoạn 24 hpi (54,38 trung tâm đại thực bào/mô) và sau đó giảm đến giai đoạn 312hpi (16,10 trung tâm đại thực bào/mô). Số lượng trung tâm đại thực bào của nhóm A tăng đến 48 hpi trong khi số lượng trung tâm đại thực bào của nhóm B chỉ tăng đến 24 hpi. Nguyên nhân có thể giải thích do đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu với sự tham gia của đại thực bào nhóm A kéo dài hơn đến giai đoạn 48 hpi giúp tăng khả năng sống sót trong giai đoạn đầu của quá trình cảm nhiễm 24 - 48 hpi. Kết quả này tương tự với kết quả trong nghiên cứu của Camp & ctv. (2000) trên cá da trơn kháng *E. ictaluri*. Nhóm cá chọn lọc kháng bệnh tạo ra nhiều trung tâm đại thực bào ở lá lách và thận hơn nhóm cá chưa qua chọn lọc trong quá trình cảm nhiễm.

Hoạt lực thực bào PA của hai nhóm A và B đều tăng từ trước cảm nhiễm đến giai đoạn 312

Bảng 4. Tổng trung tâm đại thực bào ở ba mô (gan, thận, lách) và khả năng thực bào của đại thực bào ở mô thận trước cá thuộc các gia đình kháng bệnh cao và thấp

Chỉ số khảo sát	Nhóm kháng bệnh	Số mẫu	Trước cảm nhiễm	24 hpi	48 hpi	264 hpi	312 hpi
Số lượng trung tâm đại thực bào/mô	Cao	122	18,79 ^{aw} ± 1,34	38,62 ^{by} ± 2,17	47,46 ^{bx} ± 2,14	20,16 ^{azw} ± 1,85	26,08 ^{az} ± 4,38
	Thấp	116	22,21 ^{av} ± 1,69	54,38 ^{ax} ± 2,90	15,50 ^{ay} ± 2,6	19,25 ^{ay} ± 1,35	16,10 ^{ay} ± 2,09
Hoạt lực thực bào PA (%)	Cao	35	51,69 ^{az} ± 10,68	77,11 ^{av} ± 5,45	88,02 ^{ax} ± 6,47	93,33 ^{ax} ± 3,99	93,94 ^{ax} ± 4,12
	Thấp	32	52,36 ^{az} ± 6,34	80,64 ^{av} ± 12,07	85,36 ^{axv} ± 6,63	92,86 ^{axy} ± 4,37	94,45 ^{ax} ± 2,14
Chỉ số thực bào PI (nằm men/tế bào đại thực bào)	Cao	35	1,40 ^{az} ± 0,40	2,55 ^{av} ± 0,79	5,06 ^{ax} ± 0,85	5,55 ^{ax} ± 1,30	5,11 ^{ax} ± 0,84
	Thấp	32	1,54 ^{aw} ± 0,38	3,21 ^{az} ± 1,43	4,00 ^{byz} ± 0,59	4,76 ^{axy} ± 1,23	5,66 ^{ax} ± 0,61

Các chữ cái a, b trong cùng một cột chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$ (theo nhóm gia đình kháng bệnh cao và thấp). Các chữ cái x, y, z, w trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê với $P < 0,05$.

giờ sau cảm nhiễm (hpi) (nhóm A tăng từ 51,69% lên 93,94% và nhóm B tăng từ 51,69% tăng lên 94,45%). Từ giai đoạn 48 hpi đến 312 hpi, nhóm A có PA cao hơn nhóm B.

Chỉ số thực bào PI của nhóm A tăng từ trước cảm nhiễm (1,40) đến giai đoạn 264 hpi (5,55) sau đó giảm đến giai đoạn 312 hpi (5,11). Đối với nhóm B, chỉ số thực bào PI tăng từ trước cảm nhiễm (1,54) đến giai đoạn 312 hpi (5,66). Chỉ số thực bào PI nhóm A cao hơn nhóm B có ý kiến thống kê tại giai đoạn 48 hpi ($P < 0,05$).

Sự khác biệt về hoạt lực thực bào và chỉ số thực bào giữa hai nhóm A và B thể hiện chủ yếu từ giai đoạn 48 hpi. Điều này có thể giải thích cho khả năng sống sót của cá trong nhóm kháng bệnh cao cao hơn cá trong nhóm kháng bệnh thấp trong giai đoạn đầu cảm nhiễm *E. ictaluri*. Camp & ctv. (2000) đã chỉ ra có sự khác biệt về khả năng thực bào của đại thực bào và sự miễn cảm với vi khuẩn *E. ictaluri* của cá da trơn thuộc các nhóm gia đình kháng bệnh trong giai đoạn từ 3 - 14 ngày sau cảm nhiễm. Trong nghiên cứu này, sự khác biệt về số lượng đại thực bào, hoạt động thực bào, chỉ số thực bào của hai nhóm gia đình cá kháng bệnh thể hiện chủ yếu tại giai đoạn 48 giờ sau cảm nhiễm.

4. Kết Luận

Nghiên cứu này làm rõ sự khác biệt của yếu tố miễn dịch không đặc hiệu là đại thực bào trên hai nhóm gia đình cá tra chọn giống cao và thấp thể hệ G1 trong quá trình cảm nhiễm. Số lượng tổng trung tâm đại thực bào ở ba mô gan, thận, lách, hoạt lực thực bào PA, chỉ số thực bào PI của đại thực bào mô thận trước nhóm kháng bệnh cao lớn hơn nhóm kháng bệnh thấp trong giai đoạn cảm nhiễm, đặc biệt có ý nghĩa thống kê ở giai đoạn 48 giờ sau cảm nhiễm góp phần giúp tăng khả năng kháng bệnh của nhóm kháng bệnh cao hơn so với nhóm kháng bệnh thấp trong giai đoạn đầu của quá trình cảm nhiễm.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn nào.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu chọn giống cá tra kháng bệnh gan

thận mủ, 2019 – 2020” thuộc chương trình CNSH - Bộ Nông Nghiệp và Phát triển Nông thôn. Chân thành cảm ơn các anh chị tại Trại Nghiên cứu Thực nghiệm Thủy sản Gò Vấp, Trung tâm quan trắc môi trường và bệnh Nam Bộ, Trung tâm Quốc gia Giống Thủy sản Nước ngọt Nam Bộ (thuộc Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản II) đã tạo điều kiện cho nhóm nghiên cứu thực hiện thí nghiệm cảm nhiễm.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Camp, K. L., Wolters, W. R., & Rice, C. D. (2000). Survivability and immune responses after challenge with *Edwardsiella ictaluri* in susceptible and resistant families of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Fish & Shellfish Immunology* 10(6), 475–487.
- DOF (Directorate of Fisheries). (2020). Production results of the aquaculture sector in 2019. Retrieved December 23, 2020, from <https://tongcucthuysan.gov.vn/Tin-t%E1%BB%A9c/-Tin-v%E1%BA%AFn/doc-tin/014196?2020-01-15=Banner+002>.
- Evans, D. L., Leary III, J. H., & Jaso-Friedmann, L. (2001). Nonspecific cytotoxic cells and innate immunity: Regulation by programmed cell death. *Developmental & Comparative Immunology* 25(8-9), 791-805.
- Ferguson, H. W. (2006). *Systemic pathology of fish: A text and atlas of normal tissues in teleosts and their responses in disease* (2nd ed.). London, UK: Scotian Press Publisher.
- Frøystad, M. K., Rode, M., Berg, T., & Gjøs, T. (1998). A role for scavenger receptors in phagocytosis of protein-coated particles in rainbow trout head kidney macrophages. *Developmental & Comparative Immunology* 22(5-6), 533-549.
- Gilmour, A. R., Gogel, B. J., Cullis, B. R., Welham, S. J., Thompson, R., Butler, D., Cherry, M., Collins, D., Dutkowski, G., Harding, S. A., Haskard, K., Kelly, A., Nielsen, S. G., Smith, A., Verbyla, A. P., & White, I. M. S. (2015). *ASReml user guide. Release 4.1 Structural specification*. Hemel Hempstead, UK: VSN International Ltd.
- Gjøs, H. M., Refstie, T., Ulla, O., & Gjerde, B. (1997). Genetic correlations between survival of Atlantic 382 salmon in challenge and field tests. *Aquaculture* 158(3-4), 277-288.
- Jeney, G. (2017). *Fish diseases: Prevention and control strategies* (1st ed.). Massachusetts, USA: Academic Press Publisher.
- LDSC (Lao Cai Department of Science and Technology). (2019). *Application of molecular genetics and quantitative genetics in selective breeding to improve the growth rate of striped catfish (Pangasianodon hypophthalmus)*. Retrieved May 15, 2021, from <https://www.laocai.gov.vn/1241/27929/45172/377382/khoa-hoc-va-doi-song/-ung-dung-di-truyen-phan-tu-va-di-truyen-so-luong-chon-giong-nang-cao-toc-do-sinh-truong-ca-tra->.

- Ly, L. T. T. (2008). *Environmental monitoring and precautions and aquatic diseases in some aquaculture areas in the Mekong River and Southeast region* (research report). Research Institute for Aquaculture No. 2, Ho Chi Minh City, Vietnam.
- Paredes, M., Gonzalez, K., Figueroa, J., & Montiel-Eulefi, E. (2013). Immunomodulatory effect of prolactin on Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophage function. *Fish Physiology and Biochemistry* 39(5), 1215-1221.
- Park, Y., Abihssira-García, I. S., Thalmann, S., Wiegertjes, G. F., Barreda, D. R., Olsvik, P. A., & Kiron, V. (2020). Imaging flow cytometry protocols for examining phagocytosis of microplastics and bioparticles by immune cells of aquatic animals. *Frontiers in immunology, research topic: The Function of phagocytes in non-mammals*. Retrieved February 18, 2020, from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2020.00203/full>.
- Pham, K. D., Ødegård, J., Nguyen, S. V., Gjøen, H. M., & Klemetsdal, G. (2020). Genetic analysis of resistance in Mekong striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) to bacillary necrosis caused by *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Fish Diseases* 44(2), 201-210.
- Phan, L. T., Bui, T. M., Nguyen, T. T. T., Gooley, G. J., Ingram, B. A., Nguyen, H. V., Nguyen, P. T., & De Silva, S. S. (2009). Current status of farming practices of striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* in the Mekong Delta, Vietnam. *Aquaculture* 296(3-4), 227-236.
- Shoemaker, C. A., Klesius, P. H., & Plumb, J. A. (1997). Killing of *Edwardsiella ictaluri* by macrophages from channel catfish immune and susceptible to enteric septicemia of catfish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58(2), 181-190.
- Tran, D. T. P. (2020). Estimation of genetic parameters of enteric septicemia of catfish (ESC) resistance trait of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) at fingerling stage. *Journal of Mekong Fisheries* 18, 3-13.
- Trinh, T. Q., Nguyen, V. T., Ngo, N. H., Nguyen, D. H., Nguyen, D. T., Tran, P. H., & Pham, K. D. (2016). *Breeding striped catfish resisting the bacillary necrosis* (research report). Ministry of Science and Technology, Ha Noi, Vietnam.
- Trinh, T. T., Nguyen, H. H., Nguyen, N. H., Knibb, W., & Nguyen, N. H. (2019). *Genetic Variation in disease resistance against white spot syndrome virus (WSSV) in Liptopenaeus vannamei*. *Frontiers in genetics. Research Topic: Applications of modern genetics and genomic technologies to enhance aquaculture breeding*. Retrieved March 28, 2019, from <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2019.00264/full>.

Trial on artificial breeding and laviculture of giant razor clams (*Cultellus maximus* Gmelin, 1791)

Hong T. Nguyen¹, & Nhan T. Dinh^{2*}

¹Agricultural Seed Center of Bac Lieu, Bac Lieu, Vietnam

²Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: August 09, 2021

Revised: August 23, 2021

Accepted: September 13, 2021

Keywords

Cultellus maximus

Giant razor clams

Laricultur

*Corresponding author

Dinh The Nhan

Email: dtnhan@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The study was carried out with the aim of determining the reproductive parameters and performing the rearing of giant razor clams (*Cultellus maximus* Gmelin, 1791) at larval stage and postlarval stage with different diets. The results showed that the spawning rate was $62.22 \pm 3.85\%$, the fecundity was 7.98 ± 0.67 million eggs/female, the relative fecundity was $48,081 \pm 5,826$ eggs/g female, the fertilization rate was $42.67 \pm 4.47\%$, and the hatching rate was $44.19 \pm 4.02\%$. The rearing at larval stage with different diets of algae was investigated ((T1.1): *Nanochloropsis oculata* + *Isochrysis galbana*; (T1.2): *N. oculata* + *Chaetoceros muelleri*; and (T1.3): *N. oculata* + *Isochrysis galbana* + *C. muelleri*). The results showed that T1.3 gave the survival rate, length and width of larvae, reaching $5.3 \pm 0.91\%$; 1525.60 ± 48.90 μm and 918.20 ± 28.00 μm , respectively. The parameters obtained from T1.3 were significantly higher ($P < 0.05$) than those of T1.1 and T1.2. The rearing at postlarval stage with different diets was also studied as follows: (T2.1): *N. oculata* + *I. galbana* + *C. muelleri*; (T2.2): using commercial feed (Lansy and Frippak); and (T2.3): combination of 50% of T2.1 + 50% of T2.2. The results showed that T2.1 gave the survival rate, growth in length and width of postlarvae, reaching $11.83 \pm 3.89\%$; 5.72 ± 0.61 mm and 3.31 ± 0.14 mm respectively. Growth parameters of T2.1 were significantly higher ($P < 0.05$) compared to those of T2.2 and T2.3.

Cited as: Nguyen, H. T., & Dinh, N. T. (2021). Trial on artificial breeding and laviculture of giant razor clams (*Cultellus maximus* Gmelin, 1791). *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 39-46.

Thử nghiệm sinh sản nhân tạo và ương giống ngao móng tay chúa (*Cultellus maximus* Gmelin, 1791)

Nguyễn Thanh Hồng¹ & Đinh Thế Nhân^{2*}

¹Trung Tâm Giống Nông Nghiệp Bạc Liêu, Bạc Liêu

²Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 09/08/2021

Ngày chỉnh sửa: 23/08/2021

Ngày chấp nhận: 13/09/2021

Từ khóa

Cultellus maximus

Ngao móng tay chúa

Ương nuôi ấu trùng

*Tác giả liên hệ

Đinh Thế Nhân

Email: dtnhan@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu khảo sát các chỉ tiêu sinh sản và thử nghiệm ương ngao móng tay chúa (*Cultellus maximus*) giai đoạn ấu trùng và giai đoạn giống với các khẩu phần thức ăn khác nhau. Kết quả cho thấy tỷ lệ tham gia sinh sản của ngao cái là $62,22 \pm 3,85\%$, sức sinh sản thực tế $7,98 \pm 0,67$ triệu trứng/cá thể, sức sinh sản tương đối thực tế 48.081 ± 5.826 trứng/g cá thể cái, tỷ lệ thụ tinh $42,67 \pm 4,47\%$, và tỷ lệ nở $44,19 \pm 4,02\%$. Thí nghiệm 1 ương giai đoạn ấu trùng bằng các khẩu phần tảo khác nhau NT1.1: *Nanochloropsis oculata* + *Isochrysis galbana*; NT1.2: *N. oculata* + *Chaetoceros muelleri*; và NT1.3: *N. oculata* + *Isochrysis galbana* + *C. Muelleri*. Kết quả cho thấy NT1.3 cho tỷ lệ sống, tăng trưởng chiều dài và chiều rộng của ấu trùng tương ứng là $5,3 \pm 0,91\%$; $1525,60 \pm 48,90$ μm và $918,20 \pm 28,00$ μm cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với NT1.1 và NT1.2. Thí nghiệm 2 ương giai đoạn giống bằng các khẩu phần thức ăn khác nhau: NT2.1: *N. oculata* + *I. galbana* + *C. muelleri*; NT2.2: sử dụng thức ăn tổng hợp (Lansy và Frippak); và NT2.3: kết hợp 50% NT2.1 + 50% NT2.2, kết quả cho thấy NT2.1 cho tỷ lệ sống, tăng trưởng chiều dài và chiều rộng của ấu trùng tương ứng là $11,83 \pm 3,89\%$; $5,72 \pm 0,61$ mm và $3,31 \pm 0,14$ mm cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với NT2.2 và NT 2.3.

1. Đặt Vấn Đề

Động vật thân mềm đã và đang được xem là nhóm đối tượng có ưu thế trong chiến lược phát triển nuôi thủy sản nói chung và nuôi biển nói riêng của nước ta hiện nay. Một trong các loài động vật thân mềm có giá trị kinh tế cao và đang bị khai thác cạn kiệt đó là ngao móng tay chúa (*Cultellus maximus* Gmelin, 1791). Về phân bố, ngao móng tay chúa (MTC) được tìm thấy ở một số vùng ven biển Việt Nam từ Quảng Ninh đến Cà Mau. Chúng phân bố chủ yếu ở vùng trung triều và hạ triều, nơi có nền đáy bùn nhuyễn hoặc bùn cát, địa hình bằng phẳng, độ sâu nước từ 0,3 - 10 m, thậm chí một số cá thể sống ở độ sâu 20 m. Tuy nhiên chưa xác định về mật độ quần thể và sinh lượng (Nguyễn & Hoàng, 2009).

Đã có một số nghiên cứu về đặc điểm sinh học sinh sản, thăm dò khả năng sản xuất giống trên

ngao móng tay chúa và nghiên cứu về kỹ thuật kích thích sinh sản ngao MTC (Nguyễn & Tran, 2017). Tuy nhiên việc ương MTC ở giai đoạn ấu trùng và giai đoạn giống hiện còn nhiều hạn chế và tỷ lệ sống của ấu trùng đến giai đoạn giống còn rất thấp chỉ đạt 0,93% (Nguyễn & Do, 2016). Vì vậy, việc nghiên cứu các khẩu phần thức ăn và phương pháp ương ấu trùng ngao MTC nhằm góp phần hoàn thiện qui trình sản xuất giống ngao MTC trong tương lai, cung cấp nguồn ngao MTC giống phục vụ cho nuôi thương phẩm hoặc bổ sung vào tự nhiên là rất cần thiết và có ý nghĩa trong thực tiễn.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Vật liệu thí nghiệm

Nguồn nước: Nước biển có độ mặn 28 - 30‰ được xử lý qua hệ thống lắng, lọc và sát khuẩn

bằng thuốc tím (3 ppm - 12 giờ) và chlorine (30 ppm - 24 giờ). Sau đó được trung hòa bằng Natri thiosulphat. Nguồn nước này được sử dụng để nuôi tảo, ngao bố mẹ và ương ấu trùng MTC trong các thí nghiệm.

Nguồn ngao MTC bố mẹ: Được thu mua từ các vựa hải sản tại các vùng ven biển tỉnh Cà Mau. Kích cỡ từ 140 - 200 g/con, chiều dài thân đạt từ 15 - 18 cm/con. Theo Nguyen & Do (2016), kích thước thành thực ngao MTC từ 12 - 15 cm trở lên.

Thuần dưỡng: Ngao MTC bố mẹ được thuần dưỡng trong các bể 0,5 m³, độ mặn 28 - 30‰, mật độ 15 con/m². Cho ăn 2 lần/ngày bằng tảo *Chlorella* sp và *Chaetoceros* sp (tỉ lệ 1:1), mật độ tảo khoảng 100.000 tb/mL/lần, thay nước 100% mỗi ngày.

Nguồn tảo: Các loài tảo được sử dụng trong nghiên cứu gồm *Chlorella* sp, *Nanochloropsis oculata*, *Isochrysis galbana*, *Chaetoceros muelleri*. Được nhân từ giống tảo gốc và nuôi sinh khối trong các túi nilông (50 L) làm thức ăn cho ngao bố mẹ và ấu trùng MTC.

Các vật dụng và hóa chất: Bể composite thể tích 10 m³: (1 bể), dùng để chứa nước mặn đã xử lý. Bể composite thể tích 1 m³: (2 bể), dùng để thuần dưỡng ngao MTC bố mẹ. Bể composite thể tích 0,5 m³: (3 bể), dùng để sinh sản nhân tạo trong thí nghiệm 1. Thùng nhựa thể tích 45 L: (27 thùng), dùng bố trí thí nghiệm ương ấu trùng. Máy đo pH, khúc xạ kế, kính hiển vi, máy sục khí, máy bơm, thuốc tím, Chlorine, Natri thiosulphat.

2.2. Phương pháp bố trí thí nghiệm

2.2.1. Khảo sát các chỉ tiêu sinh sản của ngao MTC

Áp dụng phương pháp kích thích ngao MTC sinh sản bằng cách hạ nhiệt độ ở 18°C trong 45 phút (Nguyen & Tran, 2017). Sau đó, cho ngao MTC vào các bể để đã chuẩn bị sẵn. Khảo sát được thực hiện trên 3 bể, mỗi bể bố trí 10 con (bể 1: 5 đực + 5 cái; bể 2: 4 đực + 6 cái; bể 3: 5 đực + 5 cái). Dựa vào màu sắc tuyến sinh dục để phân biệt đực - cái: con đực có tuyến sinh dục màu trắng sữa, con cái có tuyến sinh dục màu vàng nhạt (Nguyen & Tran, 2017). Mỗi cá thể ngao bố mẹ được cân khối lượng và đánh số thứ tự để theo dõi và ghi nhận quá trình sinh sản (SS), số lượng cá thể tham gia SS. Khi ngao MTC sinh sản xong, thu toàn bộ ngao bố mẹ và giải phẫu tuyến sinh dục để xác định số lượng cá

thể cái tham gia SS. Sức SS thực tế, sức SS tương đối thực tế, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ nở cũng được khảo sát trong thí nghiệm.

2.2.2. Thí nghiệm 1: Ương giai đoạn ấu trùng

Ấu trùng ngao MTC phát triển qua các giai đoạn ấu trùng bánh xe, ấu trùng chữ D, ấu trùng đỉnh vỏ, và cuối cùng là ấu trùng chân bò, kéo dài từ 15 - 18 ngày (Nguyen & Do (2016). Thí nghiệm được bố trí với 3 nghiệm thức (NT) khẩu phần thức ăn khác nhau, mỗi NT lặp lại 3 lần. Thời gian ương giai đoạn ấu trùng là 18 ngày. Ấu trùng được bố trí ương trong các thùng nhựa dung tích 45 L (chứa 40 L nước + đáy cát mịn dày 2 cm). Mật độ ương 10 con/mL, sục khí nhẹ liên tục:

NT1: *Nanochloropsis oculata* + *Isochrysis galbana* tỉ lệ 1:1 theo khối lượng

NT2: *N. oculata* + *Chaetoceros muelleri* tỉ lệ 1:1 theo khối lượng

NT3: *N. oculata* + *I. galbana* + *C. muelleri* tỉ lệ 1:1:1 theo khối lượng

Mật độ tảo cho ăn từ 3.000 tb/mL/lần ở ngày ương thứ nhất. Mỗi ngày tăng khẩu phần ăn thêm 1.500 tb/mL/lần theo cấp số cộng. Cho ăn 2 lần/ngày lúc 6:00 và 16:00. Định kỳ thay nước 1 ngày/lần, mỗi lần thay 20 - 30%.

2.2.3. Thí nghiệm 2: Ương giai đoạn giống

Sau khi hầu hết ấu trùng xuất hiện chân bò và biến thái xong, lúc này chúng có hình thái như ngao giống thì tiến hành thu, định lượng và bố trí thí nghiệm ương giai đoạn giống với bể ương có nền đáy cát bùn (70% cát + 30% bùn, dày 5 cm). Thí nghiệm được bố trí vào các thùng nhựa dung tích 45 L (diện tích đáy 1.200 cm²). Ngao giống được cho ăn với 3 khẩu phần khác nhau để so sánh tỷ lệ sống, tăng trưởng chiều dài và chiều rộng cơ thể. Mỗi NT lặp lại 3 lần:

NT1: Là khẩu phần ăn tốt nhất được chọn từ thí nghiệm 2

NT2: Thức ăn tổng hợp phối giữa Lansy và Frippak (Bảng 1) với tỷ lệ là 1:1 theo khối lượng

NT3: Kết hợp 50% NT1 + 50% NT2

Mật độ ương 1 con/cm², mực nước duy trì khoảng 30 cm, sục khí nhẹ liên tục từ tầng giữa của bể, tránh làm xáo trộn nền đáy. Khẩu phần ăn của NT1 từ ngày đầu là 20.000 tb/mL. Mỗi ngày khẩu phần ăn tăng lên 10.000 tb/mL theo

Bảng 1. Thành phần dinh dưỡng (%) của thức ăn tổng hợp trong NT2

Thành phần	Lansy	Frppak
Protein	48	52
Lipid	13	14,5
Fiber	2,5	3
Moisture	8	10

Nguồn: Theo công bố trên bao bì của sản phẩm.

Bảng 2. Các chỉ tiêu sinh sản (SS) ngao móng tay chứa

Chỉ tiêu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB $\pm$ SD
Tỷ lệ ngao cái tham gia SS (%)	60	66,67	60	62,22 $\pm$ 3,85
Khối lượng trung bình cá thể cái tham gia SS (g/cá thể)	164,7	165,3	166,0	165,3 $\pm$ 3,06
Sức SS thực tế (triệu trứng/cá thể)	7,76	7,52	8,67	7,98 $\pm$ 0,67
Sức SS tương đối thực tế (trứng/g cá thể)	46.518	45.477	52.249	48.081 $\pm$ 5.826
Tỷ lệ thụ tinh (%)	43,78	44,71	39,51	42,67 $\pm$ 4,47
Tỷ lệ nở (%)	40,06	45,24	47,28	44,19 $\pm$ 4,02

cấp số cộng. Khẩu phần ăn ở NT2 được cho ăn thỏa mãn theo quan sát, tránh dư thừa gây ô nhiễm nước. Cho ăn 2 lần/ngày lúc 6:00 và 16:00. Thay nước 1 lần/ngày, mỗi lần 30 - 50%.

2.3. Các chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm

Tỷ lệ sinh sản (%) = $100 \times (\text{số cá thể cái đã SS})/(\text{số cá thể cái bố trí})$

Sức SS thực tế (triệu trứng/cá thể) = $(\text{tổng số trứng trong bể})/(\text{số cá thể cái tham gia SS})$

Sức SS tương đối thực tế (trứng/g cá thể cái) = $(\text{tổng số trứng trong bể})/(\text{tổng khối lượng cá thể cái tham gia SS của bể})$

Tỷ lệ thụ tinh (%): Thu 3 mẫu (30 trứng/mẫu) ấp trong môi trường tương tự trong bể ấp, khi trứng đến giai đoạn phôi vị, đếm tổng số trứng thụ tinh và tính tỷ lệ thụ tinh = $100 \times (\text{tổng số trứng thụ tinh})/(\text{tổng số trứng mẫu thu})$

Tỷ lệ nở (%): Thu 3 mẫu (30 phôi/mẫu) ấp trong môi trường thích hợp, khi phôi nở thành ấu trùng, đếm số ấu trùng và tính tỷ lệ nở = $100 \times (\text{tổng số ấu trùng nở})/(\text{tổng số phôi mẫu thu})$.

Tỷ lệ sống ấu trùng/hậu ấu trùng (%): Định kỳ 3 ngày, thu 3 mẫu cho mỗi bể (100 mL/mẫu với giai đoạn sống trôi nổi; và 100 cm²/mẫu đối với giai đoạn sống đáy). Tỷ lệ nở (%) = $100 \times (\text{tổng số cá thể của mẫu})/(\text{tổng số cá thể tương ứng ban đầu})$.

Tăng trưởng theo chiều dài và chiều rộng: Định kỳ 3 ngày, thu 10 cá thể/bể để xác định chiều dài và chiều rộng của ấu trùng và hậu ấu trùng.

2.4. Xử lý số liệu

Các phân tích thống kê được thực hiện với các phần mềm Microsoft Excel 2016 và SPSS 20.0 for Window. Các số liệu được phân tích phương sai (ANOVA) một yếu tố ở mức ý nghĩa $P = 0,05$, và khi các ảnh hưởng được tìm thấy là có ý nghĩa, LSD được sử dụng để xác định các khác biệt cho từng cặp nghiệm thức. Các số liệu % được chuyển đổi thành arsin trước khi phân tích. Các số liệu được trình bày dưới dạng trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn.

3. Kết Quả

3.1. Kết quả sinh sản ngao móng tay chứa

Các chỉ tiêu sinh sản ngao móng tay chứa thể hiện ở Bảng 2.

3.2. Kết quả ương giai đoạn ấu trùng

Tỷ lệ sống (TLS) của ấu trùng ở cả 3 nghiệm thức đều giảm nhanh sau mỗi đợt khảo sát. Qua 6 đợt khảo sát từ ngày ương thứ 3 đến ngày thứ 18 cho thấy ở NT3 (kết hợp 3 loại tảo) luôn có TLS cao hơn (có ý nghĩa thống kê) so với NT1 và NT2. Kết thúc 18 ngày ương ở giai đoạn ấu trùng, TLS NT3 đạt 5,3% cao hơn (có ý nghĩa thống kê) so với NT1 (1,72%) và NT2 (1,56%) (Bảng 3).

Từ khi bắt đầu ương đến ngày thứ 6 tăng trưởng chiều dài và chiều rộng trung bình giữa các NT là không khác biệt. Từ đợt khảo sát ở

Bảng 3. Tỷ lệ sống (%) của ngao móng tay chứa giai đoạn ấu trùng (n = 9)

Ngày ương	NT1	NT2	NT3
3	38,4 ± 5,77 ^a	38,96 ± 7,96 ^a	57,54 ± 5,00 ^b
6	12,93 ± 1,76 ^a	11,25 ± 2,47 ^a	20,01 ± 2,8 ^b
9	7,19 ± 0,89 ^a	8,56 ± 1,38 ^a	10,56 ± 0,26 ^b
12	5,72 ± 1,77 ^a	6,32 ± 1,23 ^a	8,51 ± 0,65 ^b
15	4,24 ± 0,87 ^a	3,93 ± 0,44 ^a	7,32 ± 0,23 ^b
18	1,72 ± 0,41 ^a	1,56 ± 0,23 ^a	5,3 ± 0,91 ^b

^{a-b} Các chữ cái trên cùng hàng khác nhau biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở độ tin cậy 95%.

ngày ương thứ 9 trở đi đến ngày ương thứ 18 cho thấy tăng trưởng chiều dài và chiều rộng của ấu trùng ở NT3 (kết hợp ba loài tảo) luôn cao hơn NT1 và NT2, khác biệt có ý nghĩa thống kê. Trong khi đó tăng trưởng của ấu trùng giữa NT1 và NT2 là không có ý nghĩa thống kê (Bảng 4).

3.3. Kết quả ương ngao MTC giai đoạn giống

Kết quả về tỷ lệ sống của giai đoạn ương giống được trình bày trong Bảng 5; tăng trưởng chiều dài và chiều rộng của ấu trùng được trình bày trong Bảng 6.

Qua 8 đợt khảo sát ở giai đoạn này cho thấy TLS của ngao giống ở các NT đều giảm khá nhanh sau mỗi 3 ngày ương. Từ ngày thứ 6 ở giai đoạn này bắt đầu có sự khác biệt về TLS giữa các NT. NT1 với khẩu phần thức ăn kết hợp 3 loài tảo luôn cho TLS của ấu trùng cao hơn NT2 và NT3. Đến ngày thứ 24 TLS trung bình của NT1 đạt 11,83% cao hơn (có ý nghĩa thống kê) so với NT2 (2,88%) và NT3 (5,38%).

Tương tự như kết quả về tỷ lệ sống, tăng trưởng về chiều dài và chiều rộng của ngao giống ở NT1 cũng có kết quả cao hơn (có ý nghĩa thống kê) so với NT2 và NT3 từ ngày ương thứ 6 trở đi. Kết thúc thí nghiệm ở ngày ương thứ 24, ngao giống ở NT1 có tăng trưởng cao nhất, đạt chiều dài trung bình 5,72 ± 0,61 mm và chiều rộng trung bình 3,31 ± 0,14 mm, cao hơn (có ý nghĩa thống kê) so với NT2 (dài: 4,62 ± 0,44 mm, rộng: 2,92 ± 0,10 mm) và NT3 (dài: 4,57 ± 0,57 mm, rộng: 3,00 ± 0,10 mm).

4. Thảo Luận

Tỷ lệ SS trong thí nghiệm này đạt 62,22 ± 3,85% cao hơn so với nghiên cứu của Nguyen & Tran (2017) (38,33 ± 2,89%). Ngược lại tỷ lệ thụ tinh 42,67 ± 4,47% và tỷ lệ nở 44,19 ± 4,02%, thấp hơn tương ứng (85,81 ± 2,82%), và (81,75 ±

4,60%) so với nghiên cứu Nguyen & Tran (2017). Điều này có thể do ảnh hưởng bởi chất lượng ngao bố mẹ, mùa vụ SS hoặc điều kiện môi trường.

Theo nghiên cứu của Nguyen & Do (2016), Ngao móng tay chứa có sức sinh sản đạt 5,59 ± 0,65 triệu trứng/cá thể ở nhóm kích thước 120 - 150 g, thấp hơn so với kết quả trong nghiên cứu này, với sức SS thực tế trung bình đạt 7,98 ± 0,67 triệu trứng/cá thể ở nhóm kích thước 140 - 200 g. Như vậy rõ ràng sức SS ngao MTC tăng tỷ lệ với kích thước ngao mẹ. Tương đương với sức sinh sản của tu hài là 5,72 triệu trứng/cá thể (130 g) (Tran, 2008). Sức SS tương đối của ngao MTC trong nghiên cứu này là 48.081 ± 5.826 trứng/g, tương đương với kết quả của Nguyen & Do (2016) là 46.580 ± 400 trứng/g.

Khi ương ấu trùng ngao MTC với các khẩu phần thức ăn là tảo tươi cho thấy sự kết hợp cả 3 loài tảo *N. oculata* + *I. galbana* + *Ch. muelleri* cho kết quả cao hơn rõ rệt so với các nghiệm thức chỉ kết hợp 2 trong 3 loài tảo trên. Điều này có thể hiểu rằng ở các giai đoạn phát triển khác nhau của ấu trùng chúng cần thức ăn có kích cỡ và dinh dưỡng khác nhau. Tương tự theo nghiên cứu của Nguyen (2003) trên nghêu (*Meritrix lyrata*), khi ương ấu trùng với khẩu phần hỗn hợp 4 loài tảo: *Chaetoceros* sp + *Isochrysis* sp + *Nanochloropsis oculata* + *Platymonas* sp cho kết quả tỷ lệ sống tốt nhất (từ 8 - 25%) sau thời gian 9 - 11 ngày ương. Vì vậy, khi ương ấu trùng ngao MTC trong giai đoạn ấu trùng nên kết hợp nhiều loài tảo với nhau trong khẩu phần sẽ giúp cải thiện tỷ lệ sống của ấu trùng.

Khi ương ngao MTC giai đoạn giống thì khẩu phần kết hợp 3 loài tảo trên vẫn cho kết quả tốt nhất, cao hơn rõ rệt so với các khẩu phần có sử dụng thức ăn tổng hợp (Lansy và Frippak). Nghiên cứu của Tran (2008) cho rằng khi ương ấu trùng tu hài (*Lutraria rhynchaena*) bằng hỗn hợp tảo đơn bào (*Nanochloropsis* sp, *Chaetoceros* sp, *Platymonas* sp) cho TLS cao nhất so với các

Bảng 5. Tỷ lệ sống (%) của ngao móng tay chứa giai đoạn ương giống (n = 9)

Ngày ương	Chiều dài (µm)			Chiều rộng (µm)		
	NT1	NT2	NT3	NT1	NT2	NT3
3	61,88 ± 7,75 ^a	54,00 ± 3,36 ^a	58,42 ± 8,66 ^a			
6	53,25 ± 5,41 ^a	38,92 ± 1,01 ^b	47,25 ± 2,84 ^{ab}			
9	41,00 ± 3,85 ^a	32,67 ± 2,52 ^b	37,59 ± 1,51 ^{ab}			
12	38,00 ± 1,98 ^a	17,00 ± 0,75 ^c	24,17 ± 1,23 ^b			
15	27,17 ± 2,13 ^a	11,75 ± 1,32 ^b	14,83 ± 1,84 ^b			
18	18,17 ± 2,36 ^a	5,67 ± 0,88 ^b	9,00 ± 1,34 ^b			
21	13,79 ± 5,01 ^a	3,42 ± 0,63 ^b	6,00 ± 1,52 ^b			
24	11,83 ± 3,89 ^a	2,88 ± 0,33 ^b	5,38 ± 1,69 ^b			

^{a-c} Các chữ cái trên cùng hàng khác nhau biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở độ tin cậy 95%.

Bảng 4. Tăng trưởng của ấu trùng ngao móng tay chứa về chiều dài và chiều rộng (n = 30)

Ngày ương	Chiều dài (µm)			Chiều rộng (µm)		
	NT1	NT2	NT3	NT1	NT2	NT3
Bắt đầu	92,87 ^a ± 6,27	94,42 ^a ± 5,04	93,80 ^a ± 5,1	58,44 ^a ± 2,66	59,03 ^a ± 2,36	59,41 ^a ± 2,68
3	165,21 ^a ± 30,03	158,90 ^a ± 21,66	167,20 ^a ± 27,75	83,46 ^a ± 17,3	81,31 ^a ± 14,43	88,26 ^a ± 19,99
6	310,18 ^a ± 18,04	314,55 ^a ± 4,6	325,52 ^a ± 24,81	163,15 ^a ± 6,72	164,71 ^a ± 8,26	169,79 ^a ± 11,45
9	483,20 ^a ± 16,84	492,91 ^a ± 12,72	525,62 ^b ± 16,14	268,97 ^a ± 8,94	276,85 ^a ± 9,79	295,51 ^b ± 12,9
12	696,90 ^a ± 32,68	708,05 ^a ± 34,89	781,76 ^b ± 33,06	442,83 ^a ± 33,04	491,36 ^{ab} ± 46,2	536,43 ^b ± 36,18
15	876,78 ^a ± 67,40	875,88 ^a ± 56,60	1076,40 ^b ± 69,80	532,84 ^a ± 29,46	500,56 ^a ± 16,26	595,98 ^b ± 31,36
18	1144,00 ^a ± 61,00	1173,80 ^a ± 56,50	1525,60 ^b ± 48,90	712,58 ^a ± 29,47	717,44 ^a ± 26,80	918,20 ^b ± 28,00

^{a-b} Các chữ cái trên cùng hàng khác nhau biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở độ tin cậy 95%.

Bảng 6. Tăng trưởng về chiều dài và chiều rộng của ngao móng tay chứa giai đoạn ương giống (n = 30)

Ngày ương	Chiều dài (mm)			Chiều rộng (mm)		
	NT1	NT2	NT3	NT1	NT2	NT3
Bắt đầu	1,37 ^a ± 0,11	1,33 ^a ± 0,11	1,37 ^a ± 0,09	0,87 ^a ± 0,12	0,87 ^a ± 0,08	0,87 ^a ± 0,09
3	1,75 ^a ± 0,2	1,61 ^a ± 0,18	1,60 ^a ± 0,2	1,35 ^a ± 0,04	1,23 ^b ± 0,1	1,2 ^b ± 0,1
6	2,35 ^a ± 0,14	2,04 ^c ± 0,14	2,19 ^b ± 0,19	1,51 ^a ± 0,27	1,26 ^b ± 0,08	1,36 ^{ab} ± 0,10
9	2,87 ^a ± 0,24	2,46 ^b ± 0,21	2,61 ^b ± 0,23	2,17 ^a ± 0,13	1,94 ^b ± 0,12	2,04 ^b ± 0,12
12	3,42 ^a ± 0,26	2,96 ^b ± 0,15	2,98 ^b ± 0,13	2,39 ^a ± 0,16	2,08 ^b ± 0,14	2,11 ^b ± 0,16
15	4,23 ^a ± 0,21	3,40 ^b ± 0,33	3,53 ^b ± 0,15	2,85 ^a ± 0,17	2,47 ^b ± 0,09	2,52 ^b ± 0,15
18	4,50 ^a ± 0,3	3,83 ^c ± 0,45	4,16 ^b ± 0,3	3,12 ^a ± 0,12	2,88 ^b ± 0,17	2,76 ^b ± 0,37
21	5,67 ^a ± 0,40	4,54 ^b ± 0,44	4,76 ^b ± 0,57	3,37 ^a ± 0,11	2,86 ^c ± 0,10	3,01 ^b ± 0,10
24	5,72 ^a ± 0,61	4,62 ^b ± 0,44	4,57 ^b ± 0,57	3,31 ^a ± 0,14	2,92 ^b ± 0,10	3,00 ^b ± 0,10

^{a-c}Các chữ cái trên cùng hàng khác nhau biểu diễn sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức ở độ tin cậy 95%.

nghiệm thức có sử dụng bán phần hoặc toàn phần thức ăn tổng hợp (Lansy và Frippak). Nghiên cứu của Phung & Tran (2019) cho thấy khi ương ấu trùng sò huyết giai đoạn trôi nổi bằng hỗn hợp 3 loài tảo đơn bào: *N. oculata* + *I. galbana* + *Ch. calcitrans* cho TLS và tăng trưởng cao nhất so với các nghiệm thức chỉ kết hợp 2 trong 3 loài tảo trên. Tương tự đối với nghêu (*Meritrix lyrata*) khi ương ở giai đoạn trôi nổi và sống đáy cũng cho kết quả tốt nhất với hỗn hợp 3 loài tảo trên (Chu & Martin, 2008). Như vậy đối với ấu trùng và hậu ấu trùng các loài nhuyễn thể nói chung và ngao MTC nói riêng thì thức ăn thích hợp là các loài tảo đơn bào hơn là thức ăn tổng hợp dạng bột.

Tỷ lệ sống của ấu trùng và hậu ấu trùng ngao MTC giảm nhanh trong quá trình ương. Điều này cũng phù hợp theo qui luật tự nhiên của hầu hết các loài nhuyễn thể. Ở giai đoạn ấu trùng, TLS ở nghiệm thức tốt nhất đạt 5,3%, giai đoạn hậu ấu trùng đạt tỷ lệ sống cao nhất 11,83%. Như vậy TLS tích lũy qua 2 giai đoạn (42 ngày tuổi) đạt khoảng 0,62%. Theo Nguyen & Do (2016), khi khảo sát TLS của ấu trùng ngao MTC đến giai đoạn giống là 0,93%, thấp hơn so với TLS của tu hài (*Lutraria rhynchaena*) khi ương đến kích thước 2-3 mm đạt 5-6% (Tran, 2008). Theo Tran (2011) sau khi hoàn thiện qui trình sản xuất giống tu hài, TLS từ ấu trùng đến con giống cấp 1 đạt trung bình 16,1%, đến giống cấp 2 đạt trung bình 9,96%. Vì vậy TLS của ngao MTC giống có thể sẽ được cải thiện sau khi hoàn thiện qui trình ương.

Ấu trùng và hậu ấu trùng ngao MTC phát triển và tăng kích thước khá nhanh trong quá trình ương. Sau 18 ngày ương, kết thúc giai đoạn ấu trùng sống trôi nổi, ấu trùng đạt chiều dài khoảng 1,4 mm. Khi ương tiếp 24 ngày, hậu ấu trùng tăng trưởng khá nhanh và đạt chiều dài trung bình khoảng 5 mm (42 ngày tuổi), tương đương với tu hài giống cấp 1 (45 ngày tuổi) là 5 mm (Tran, 2011).

5. Kết Luận

Kết quả khảo sát các chỉ tiêu SS trong nghiên cứu này cho thấy tỷ lệ tham gia SS là 62,22 ± 3,85%, sức SS thực tế 7,98 ± 0,67 (triệu trứng/cá thể), sức SS tương đối thực tế 48.081 ± 5.826 (trứng/g cá thể cái), tỷ lệ thụ tinh 42,67 ± 4,47% và tỷ lệ nở 44,19 ± 4,02%.

Ương ngao MTC ở giai đoạn ấu trùng bằng hỗn hợp tảo *Nanochloropsis oculata* + *Isochrysis*

galbana + *Chaetoceros muelleri*, với mật độ ương 10 ấu trùng/mL cho tỷ lệ sống, tăng trưởng chiều dài và chiều rộng của ấu trùng là cao nhất tương ứng $5,3 \pm 0,91\%$, $1,525,60 \pm 48,90 \mu\text{m}$ và $918,20 \pm 28,00 \mu\text{m}$.

Ương ngao MTC ở giai đoạn giống bằng khẩu phần thức ăn kết hợp 3 loài tảo: *N. oculata* + *I. galbana* + *C. muelleri*, với mật độ ương 1 con/cm² cho TLS, tăng trưởng chiều dài và chiều rộng của hậu ấu trùng là cao nhất tương ứng $11,83 \pm 3,89\%$, $5,72 \pm 0,61 \text{ mm}$ và $3,31 \pm 0,14 \text{ mm}$.

Đề nghị tiếp tục nghiên cứu ương ngao móng tay chúa giai đoạn giống 3 - 5 cm với các mật độ, nền đáy và khẩu phần thức ăn khác nhau để hoàn thiện qui trình sản xuất giống.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn nào.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Chu, T. C., & Martin, K. S. (2008). *Seed production techniques of Ben Tre clam (Meretrix lyrata Sowerby, 1851)*. Retrieved May 1, 2021, from https://tailieuchung.com/vn/dIID671624_tai-lieu-ve-ky-thuat-san-xuat-giong-ngao-ben-tre.html.
- Nguyen, H. D. (2003). Research on production of seed clams (*Meretrix lyrata*). *The 3rd National Conference on Molluscs (100-114)*. Nha Trang, Vietnam: Agricultural Publishing House. Retrieved May 1, 2021, from <https://123docz.net/document/4321030-tuyen-tap-bao-cao-khoa-hoc-hoi-thao-dong-vat-than-mem-toan-quoc-lan-thu-ba-nha-trang-11-12.htm>.
- Nguyen, H. Q., & Hoang, C. D. (2009). *Resources of bivalve molluscs in some typical coastal mangrove areas of Vietnam*. Retrieved May 10, 2021, from <https://www.researchgate.net/publication/322075509>.
- Nguyen, M. D., & Do, P. T. (2016). Study on reproductive biology and artificial breeding in razor clam (*Cultellus maximus* Gmelin, 1791). *Mekong River Fisheries Magazine* 8, 32-44.
- Nguyen, T. Q., & Tran, H. N. (2017). Technical to reproductive stimulation for winter's razor clams (*Cultellus maximus* Gmelin, 1791). *Mekong River Fisheries Magazine* 10, 3-11.
- Phung, B., & Tran, T. T. (2019). *Developing technical criteria for artificial seed production and experimenting on Meretrix lyrata production in Ben Tre*. Retrieved June 15, 2021, from <http://dost-bentre.gov.vn/tin-tuc/2234/xay-dung-chi-tieu-ky-thuat-san-xuat-giong-nhan-tao-va-thuc-nghiem-san-xuat-so-huyet-tai-ben-tre>.
- Tran, M. T. (2011). *Final report of the project "Improving technology for seed production and commercial culture of Lutraria philippinarum"*. Retrieved July 2, 2021, from <https://123docz.net/document/1309730-hoan-thien-cong-nghe-san-xuat-giong-va-nuoi-thuong-pham-tu-hai-lutraria-philippinarum.htm>.
- Tran, T. T. (2008). *Final report of the project "Improving the technological process of seed production and commercial culture of Lutraria rhynchaena Jonas 1844, in Khanh Hoa"*. Retrieved May 10, 2021, from <https://123docz.net/document/1376665-hoan-thien-quy-trinh-cong-nghe-san-xuat-giong-nhan-tao-va-nuoi-thuong-pham-tu-hai-lutraria-rhynchaena-jonas-1844-tai-khanh-hoa.htm>.

Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from the white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) collected from Binh Dien Agricultural Wholesale Market

Hue N. D. Truyen*, Thanh N. Khuu, Nhu T. B. Do, & Thu N. T. Tran

Faculty of Fisheries, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: June 18, 2021

Revised: September 10, 2021

Accepted: September 17, 2021

Keywords

Antibiotic resistance

Antibiotics

E. coli

Litopenaeus vannamei

Multidrug-resistant

***Corresponding author**

Truyen Nha Dinh Hue

Email: nhahuets@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

This study was conducted to determine the rate of antibiotic resistance, multiple antibiotic resistance of 60 *E. coli* strains isolated from white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) collected from Binh Dien Agricultural Wholesale Market in Ho Chi Minh City. With in 10 examined antibiotics, those *E. coli* strains showed a high resistant level to ampicillin (96.7%), streptomycin (70.0%), kanamycin (66.7%), nalidixic acid (60.0%), tetracyclines và trimethoprim/sulfamethoxazole (56.7%), ciprofloxacin (61.7%), chloramphenicol (43.3%). The percentage of multidrug-resistant strains (from 5 to 10 tested antibiotics) was 55%. All isolated, strains were insensitive to all 10 tested antibiotics. Four strains (6.7%) were found to be resistant to all these antibiotics.

Cited as: Truyen, H. N. D., Khuu, T. N., Do, N. T. B, & Tran, T. N. T. (2021). Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from the white-leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) collected from Binh Dien Agricultural Wholesale Market. *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 47-52.

Sự đề kháng kháng sinh của vi khuẩn *Escherichia coli* phân lập từ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) thương mại tại chợ đầu mối nông sản Bình Điền

Truyện Nhã Định Huệ*, Khuê Nhật Thành, Đỗ Thị Bảo Như & Trần Nguyễn Thanh Thư

Khoa Thủy Sản, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 18/06/2021

Ngày chỉnh sửa: 10/09/2021

Ngày chấp nhận: 17/09/2021

Từ khóa

Đa kháng kháng sinh

E. coli

Kháng kháng sinh

Kháng sinh

Litopenaeus vannamei

*Tác giả liên hệ

Truyện Nhã Định Huệ

Email: nhahuets@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá tỷ lệ kháng kháng sinh, đa kháng kháng sinh của 60 chủng *E. coli* phân lập từ tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) thương mại tại chợ đầu mối nông sản thực phẩm Bình Điền, TP.HCM. Kết quả kiểm tra kháng sinh đồ của các chủng *E. coli* phân lập được cho thấy có tỷ lệ kháng cao với ampicillin (96,7%), streptomycin (70%), kanamycin (66,7%), nalidixic acid (60%), tetracyclines và trimethoprim/sulfamethoxazole (56,7%), đặc biệt ciprofloxacin (61,7%), chloramphenicol (43,3%). Tỷ lệ đa kháng từ 5 đến 10 loại kháng sinh là 55%, đặc biệt không có chủng nào nhạy cảm với cả 10 loại kháng sinh và có 4 chủng (chiếm 6,7%) kháng với tất cả các loại kháng sinh thử nghiệm.

1. Đặt Vấn Đề

Thủy sản đóng một vai trò quan trọng trong sự phát triển kinh tế đất nước; quy mô của ngành hiện đang ngày càng mở rộng và vai trò của ngành cũng tăng lên không ngừng trong nền kinh tế quốc dân. Từ năm 2001, xuất khẩu thủy sản Việt Nam tăng nhanh về cả giá trị và khối lượng. Trong các mặt hàng thủy sản xuất khẩu, tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) là một đối tượng chủ lực. Mặc dù, kim ngạch xuất khẩu tôm liên tục tăng trưởng, tuy nhiên ngành tôm cũng đang gặp không ít bất lợi do tác động của biến đổi khí hậu cũng như tình hình dịch bệnh. Việc sử dụng kháng sinh trong phòng và trị bệnh tạo nên các áp lực lên xuất khẩu khi hàng rào kỹ thuật về dịch bệnh, tồn dư hóa chất kháng sinh ngày càng được siết chặt.

E. coli là vi sinh vật chỉ thị phổ biến để đánh giá chất lượng thực phẩm và nước uống, một số

loài *E. coli* cũng là tác nhân gây ngộ độc thực phẩm (Nguyen & Truyen, 2019). Trong những năm gần đây, các báo cáo về *E. coli* kháng kháng sinh ngày càng nhiều, nhưng chủ yếu là trên mẫu bệnh phẩm của người và động vật trên cạn, tuy nhiên, trên động vật thủy sản thì có rất ít báo cáo. Thêm vào đó, nhu cầu sử dụng thực phẩm thủy sản tươi sống ngày càng gia tăng. Vi khuẩn cộng sinh đa kháng kháng sinh có thể lan truyền sang các vi khuẩn cộng sinh hay gây bệnh trong thủy vực và cả trên người (Heuer & ctv., 2009). Việc tìm hiểu tình hình kháng và đa kháng kháng sinh của *E. coli* trên tôm thẻ chân trắng thương mại là rất cần thiết.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

Nghiên cứu được tiến hành từ tháng 07 năm 2020 đến tháng 06 năm 2021 tại Phòng thí nghiệm Bệnh học Thủy Sản, Trường Đại học

Nông Lâm TP.HCM.

Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) sống, có trọng lượng 20 - 25 g/con được thu mua tại Chợ đầu mối nông sản thực phẩm Bình Điền (quận 8, TP.HCM). Tôm thu mua có nguồn gốc từ nhiều tỉnh thành khác nhau như Cà Mau, Kiên Giang, Bến Tre, Đồng Nai, Bạc Liêu, TP.HCM.

Phân lập *E. coli* từ hệ đường ruột tôm dựa trên phương pháp được mô tả bởi Tonguthai & ctv. (1999) và định danh sơ bộ dựa trên phương pháp được mô tả bởi Cooke & ctv. (1969) có hiệu chỉnh để phù hợp điều kiện thực tế. Cụ thể phân lập đường ruột tôm trên môi trường chọn lọc CHROMagar™ *E. coli* (Chromagar Microbiology, Pháp). Các kiểm tra sơ bộ được thực hiện bao gồm nhuộm Gram, di động, oxidase, catalase, cấy kiểm tra trên môi trường chọn lọc Eosin Methylene Blue Agar (EMB) (Himedia, Ấn Độ) và sử dụng bộ IDS 14 GNR (Nam Khoa Biotek) cho việc định danh vi khuẩn phân lập được.

Các chủng *E.coli* được kiểm tra kháng sinh đồ theo phương pháp khuếch tán đĩa kháng sinh (CLSI, 2012). Các loại kháng sinh thử nghiệm gồm: ampicillin 10 µg (AMP), gentamicin (GEN), streptomycin 10 µg (S), kanamycin 30 µg (K), doxycycline 10 µg (DO), tetracycline 30 µg (Te), nalidixic acid 30 µg (Ng), ciprofloxacin 30 µg (Ci), trimethoprim/sulfamethoxazole 25 µg (Bt), chloramphenicol 30 µg (Cl) (Nam Khoa Biotek). Chủng đối chứng tham khảo *E.coli* ATCC 25922 được sử dụng trong mỗi đợt thí nghiệm. Biện luận đường kính vòng vô khuẩn của các vi khuẩn kiểm tra theo tiêu chuẩn của Viện Tiêu chuẩn Lâm sàng và Xét nghiệm (CLSI, 2012) từ đó đánh giá khả năng nhạy cảm của vi khuẩn đối với kháng sinh theo các mức độ nhạy, trung gian và kháng. Trong nghiên cứu này, nhiệt độ ủ của các môi trường nuôi cấy ở 30°C trong 24 giờ.

Phương pháp xử lý số liệu: Dùng phần mềm Microsoft Excel 2010 để nhập số liệu, tính giá trị trung bình và vẽ biểu đồ.

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Tỷ lệ đề kháng kháng sinh

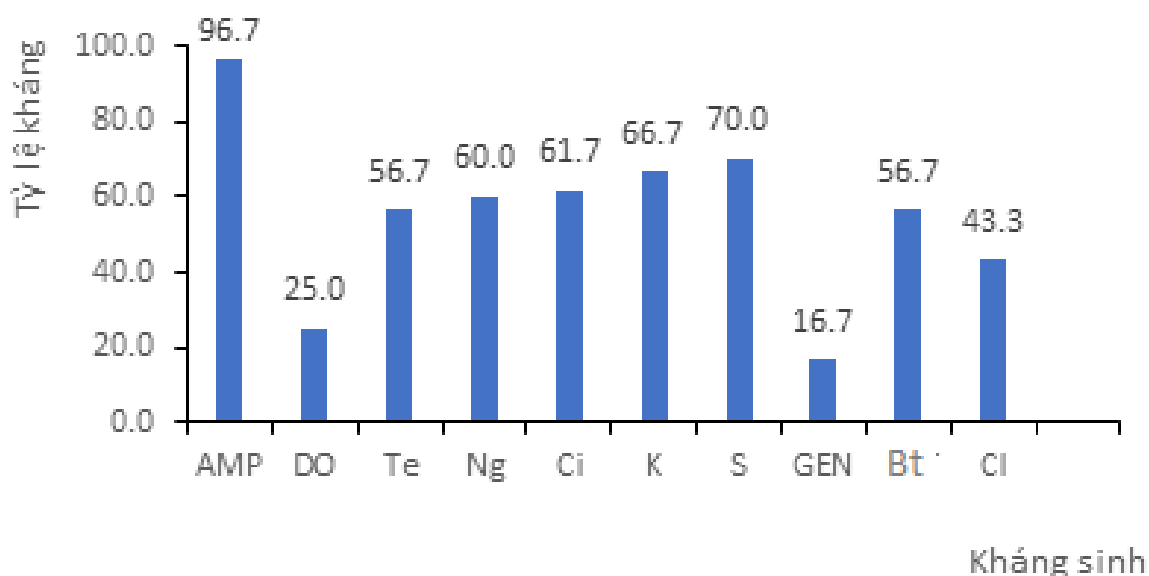
Tỷ lệ kháng kháng sinh của 60 chủng *E.coli* phân lập từ mẫu tôm thẻ với 10 loại kháng sinh thử nghiệm như sau: AMP (96,7%), S (70%), K (66,7%), Ci (61,7%), Ng (60%), Te (56,7%), Bt (56,7%), Cl (43,3%), DO (25%) và Ge (16,7%) (Hình 1). Trong đó, có 7/10 loại kháng

sinh thử nghiệm có tỷ lệ kháng cao hơn 50%. Thêm vào đó, ampicillin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole nằm trong danh mục hạn chế sử dụng, đặc biệt là chloramphenicol và ciprofloxacin đã được đưa vào danh sách kháng sinh cấm sử dụng (MARD, 2016).

Ampicillin là kháng sinh thuộc nhóm betalactam có tác động sát khuẩn trên cả vi khuẩn Gram dương và Gram âm (Nguyen & Truyen, 2019). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ vi khuẩn *E. coli* kháng với kháng sinh ampicillin ở mức cao nhất trong các loại kháng sinh thử nghiệm lên đến 96,7%. Trên ao nuôi thủy sản, Dang (2005) đã ghi nhận kết quả 78% vi khuẩn kháng với kháng sinh ampicillin. Đặc biệt, tỷ lệ *E. coli* phân lập từ mẫu ruột tôm thương mại, kháng kháng sinh ampicillin khá cao là 83,1% (Nguyen & Truyen, 2019).

Nhóm kháng sinh aminoglycosides, trừ gentamicin, có tỷ lệ kháng khá cao so với các loại kháng sinh khác; streptomycin, kanamycin và gentamicin theo thứ tự có tỷ lệ kháng là 70%, 66,7% và 16,7%. Một số nghiên cứu về tỷ lệ kháng kháng sinh streptomycin gần đây cũng cho thấy trong nhóm aminoglycosides, streptomycin có tỷ lệ kháng cao hơn so với các loại kháng sinh còn lại cùng nhóm. Nguyen (2012) nghiên cứu trên cá da trơn tỷ lệ vi khuẩn kháng kháng sinh streptomycin là 49,7% cao hơn các kháng sinh còn lại trong nhóm (gentamycin 6,4% và kanamycin 14%). Tuy nhiên, kết quả kháng kháng sinh của nhóm aminoglycosides trong nghiên cứu này khác so với nghiên cứu của Nguyen & Truyen (2019), cụ thể, tỷ lệ kháng kháng sinh của streptomycin, kanamycin và gentamicin theo thứ tự là 31,5%, 20,8% và 26,2%. Theo Bui & ctv. (2001), streptomycin, gentamycin và neomycin ít hấp thụ qua đường tiêu hóa nên thường có thể sử dụng qua đường tiêm trong y học và thú y, do đó, chúng nên được hạn chế sử dụng trong nuôi trồng thủy sản. Theo Tolmasky (2000), vi khuẩn kháng với một kháng sinh trong nhóm aminoglycosides này có thể nhạy cảm với một kháng sinh khác cùng nhóm, vi khuẩn kháng nhanh với streptomycin có thể là do các plasmid trung gian. Vì vậy, có thể giải thích tại sao tỷ lệ kháng giữa các kháng sinh trong nhóm là khác nhau và mặc dù ít sử dụng trong nuôi trồng thủy sản nhưng tỷ lệ kháng streptomycin của vi khuẩn *E. coli* được báo cáo là khá cao.

Tetracycline được sử dụng khá lâu, phổ biến, rộng rãi trong phòng chống bệnh, thúc đẩy tăng



Hình 1. Tỷ lệ kháng kháng sinh của các chủng *E. coli* thu được.

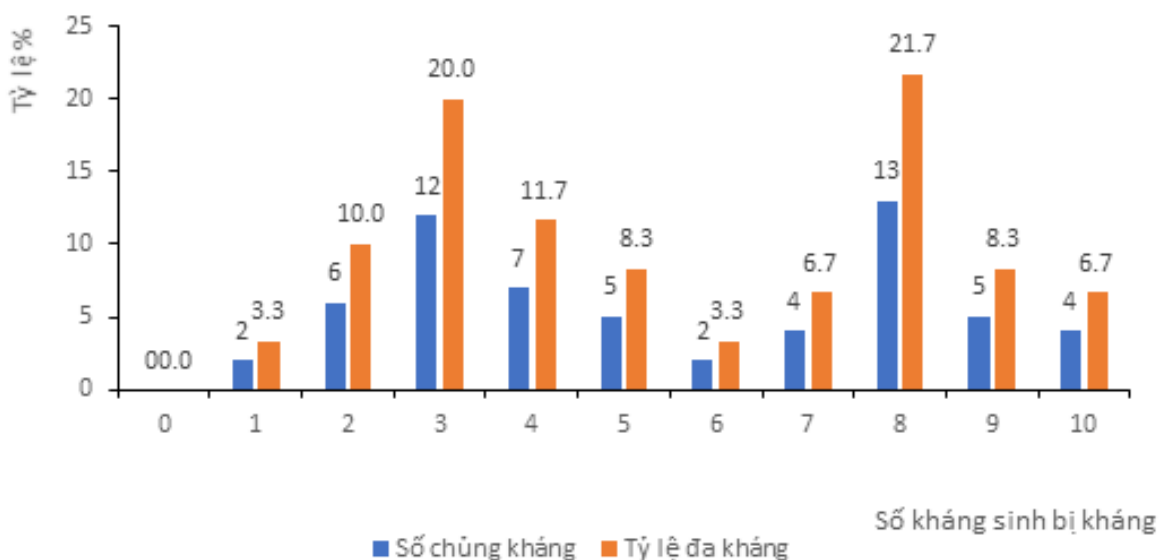
AMP: ampicillin; DO: doxycycline; Te: tetracycline; Ng: nalidixic acid; Ci: ciprofloxacin; K: kanamycin; S: streptomycin; GEN: gentamicin; Bt: trimethoprim/sulfamethoxazole; Cl: chloramphenicol.

trường và đã bị đề kháng (Roberts, 1996). Trong kết quả cho thấy, có 56,7% số chủng vi khuẩn *E. coli* kháng với tetracycline và 25% số chủng vi khuẩn *E. coli* kháng với doxycycline. Trong nghiên cứu của Nguyen & Truyen (2019), tỷ lệ *text* kháng kháng sinh tetracycline là 73,8% và doxycycline là 64,6%.

Mức độ đề kháng đối với chất ức chế nhóm tổng hợp axit folic đối với trimethoprim/sulfamethoxazole là 56,7%, chloramphenicol 43,3 và streptomycin 70%. Theo Serrano (2005), tỷ lệ kháng kháng sinh trimethoprim/sulfamethoxazole khá cao (63,6%) do kháng sinh này thường sử dụng để điều trị bệnh nhiễm khuẩn Gram âm trong nuôi trồng thủy sản ở các nước châu Á (Serrano, 2005). Ở Thái Lan, vi khuẩn kháng kháng sinh chloramphenicol, streptomycin và trimethoprim/sulfamethoxazole đã được phát hiện ở hệ thống nuôi cá kết hợp với gà (Petersen & Dalsgaard, 2003). Tỷ lệ kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* trên mẫu ruột của tôm thương phẩm mua tại các chợ trên địa bàn quận 9 và Thủ Đức là trimethoprim/sulfamethoxazole 63,2%, chloramphenicol 60,8%, streptomycin 31,5% (Nguyen & Truyen, 2019). Chloramphenicol (Cl) có tỷ lệ kháng 43,3% dù kháng sinh này đã nằm trong danh sách kháng sinh cấm sử dụng trong sản xuất, kinh doanh

thủy sản từ năm 2005. Theo Tendencia & de la Pena (2001) phân lập được vi khuẩn kháng với chloramphenicol và một số kháng sinh khác từ nước, bùn đáy ao và tôm sú nuôi từ các ao nuôi tôm. Sự kháng kháng sinh của các dòng vi khuẩn kháng chloramphenicol thu từ các ao nuôi thủy sản đã được xác định trên 196 dòng vi khuẩn được thử với sáu loại kháng sinh và kết quả kháng sinh đồ cho thấy số dòng chỉ kháng chloramphenicol chiếm tỷ lệ 2%. Phần lớn các dòng vi khuẩn thí nghiệm có thể kháng với nhiều loại kháng sinh. Có 59% dòng vi khuẩn kháng bốn hay năm loại kháng sinh trong đó có chloramphenicol. Có 34% kháng nhiều kháng sinh như chloramphenicol, ampicillin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole hoặc chloramphenicol, ampicillin, tetracycline, trimethoprim/sulfamethoxazole và nitrofurantoin (Dang, 2005). Mặc dù bị cấm sử dụng nhưng vi khuẩn đề kháng chloramphenicol vẫn gia tăng có thể liên quan đến việc sử dụng thuốc bừa bãi, không rõ nguồn gốc của người dân.

Quinolones là một trong những loại kháng sinh được kê toa phổ biến nhất trên thế giới và được sử dụng để điều trị nhiều bệnh nhiễm khuẩn ở người. Do sử dụng rộng rãi và bị lạm dụng quá mức, số lượng chủng vi khuẩn kháng quinolones đã tăng lên đều đặn kể từ những năm 1990. Nalidixic



Hình 2. Tỷ lệ đa kháng kháng sinh tại các địa điểm thu mẫu.

acid là thế hệ thứ nhất của quinolones được đưa vào bệnh viện trong năm 1960 để điều trị các bệnh nhiễm trùng đường tiết niệu không biến chứng do vi khuẩn đường ruột. Thế hệ thứ hai ciprofloxacin đã tạo ra một loạt các quinolones thế hệ mới có hoạt động rộng hơn, đặc biệt đối với các loài Gram dương (Katie & ctv., 2014). Nhóm kháng sinh quinolones ức chế sự tổng hợp DNA của vi khuẩn thông qua việc ức chế enzyme DNA - gyrase. Từ Hình 1 cho thấy Ng có tỷ lệ kháng 60% thấp hơn ciprofloxacin (nằm trong danh sách kháng sinh cấm sử dụng trong sản xuất và kinh doanh thủy sản năm 2005) với tỷ lệ kháng 61,7%.

3.2. Tỷ lệ đa kháng kháng sinh

Theo số liệu của Hình 2 nhận thấy, không có chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập trong nghiên cứu này nhạy cảm với cả 10 loại kháng sinh thử nghiệm. Có 55% chủng vi khuẩn thể hiện tính đa kháng từ 5 - 10 loại kháng sinh thử nghiệm. Có 4 chủng *E. coli* (chiếm 6,7%) thể hiện tính kháng với 10 kháng sinh thử nghiệm. Tình hình đa kháng kháng sinh ngày càng diễn biến phức tạp một số nghiên cứu gần đây ghi nhận được một số kết quả đáng lo ngại. Theo báo cáo Nguyen & Truyen (2019), có tới 73% số chủng *E.coli* phân lập từ tôm thương phẩm thể hiện tính đa kháng với 4 - 10 loại kháng sinh thử nghiệm.

4. Kết Luận

Các chủng vi khuẩn *E. coli* phân lập từ mẫu tôm thẻ chân trắng thương mại tại chợ đầu mối Bình Điền có tỷ lệ kháng kháng sinh khá cao ở một số loại kháng sinh và có sự tương đồng với các nghiên cứu của các tác giả trước. Đặc biệt, tỷ lệ các chủng *E. coli* kháng các loại kháng sinh nằm trong danh mục kháng sinh cấm, hạn chế sử dụng của Bộ Nông nghiệp ở mức từ 43,3 - 96,7%. Tính đa kháng kháng sinh của vi khuẩn *E. coli* cho thấy có 55% chủng vi khuẩn thể hiện tính đa kháng kháng sinh từ 5 - 10 loại kháng sinh thử nghiệm, trong đó có 6,7% số chủng thể hiện tính kháng với 10 loại kháng sinh.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn nào.

Lời Cảm Ơn

Tác giả trân trọng cảm ơn cô Võ Thị Trà An đã hỗ trợ chủng đối chứng *E. coli* ATCC 25922 và các bạn sinh viên Lâm Thúy Đăng, Nguyễn Ngọc Trâm, Trần Thị Bích Trâm lớp DH17NY đã hỗ trợ cho thí nghiệm.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Bui, T. K., Bui, H. K., & Bui, T. K. (2001). *Antibiotics*. Department of Science and Technology, Ba Ria Vung Tau, Vietnam.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). (2012). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Pennsylvania, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute
- Cooke, E. M., Ewins, S., and Shooter, R. A. (1969). Changing faecal population of *Escherichia coli* in hospital medical patients. *British Medical Journal* 4, 593-595.
- Dang, O. T. H. (2005). Antibiotic susceptibility testing of aquaculture associated bacteria originating from integrated farming systems in the Mekong River Delta, Viet Nam. *Can Tho University Journal of Science* 4, 136-144.
- Heuer, O. E., Kruse, H., Grave, K., Collignon P., Karunasagar, I., & Frederick, J. A. (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases* 49, 1248-1253.
- Katie, J. A., Robert, J. K., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 53(10), 1565-1574.
- MARD (Ministry of Agriculture and Rural Development). (2021). Decision No 10/2016/TTBNNPTNT dated June 01, 2016, List of veterinary drugs permitted to be marketed and banned from use in Vietnam. Retrieved June 27, 2021, from http://vanban.chinhphu.vn/portal/page/portal/chinhphu/hethongvanban?class_id=1&mode=detail&document_id=186403.
- Nguyen, K. H. N. (2012). *Molecular characterisation of antibiotic resistant bacteria isolated from farmed catfish and humans in Vietnam* (Doctoral dissertation). RMIT University, Victoria, Australia.
- Nguyen, K. H. N., & Truyen, H. N. D. (2019). Antibiotic resistance of *E. coli* isolated from whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) collected from wet markets and supermarkets in Ho Chi Minh city and their transferability. *The Journal of Agriculture and Development* 18(2), 97-104.
- Petersen, A., & Dalsgaard, A. (2003). Species composition and antimicrobial resistance genes of *Enterococcus* spp., isolated from integrated and traditional fish farms in Thailand. *Environmental Microbiology* 5(5), 395-402.
- Roberts, M. C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Review* 19(1), 1-24.
- Serrano, P. H. (2005). Responsible use of antibiotics in aquaculture. Rome, Italy: Food And Agriculture Organization of The United Nations.
- Tendencia, E. A., & de la Peña, L. D. (2001). Antibiotic resistance of bacteria from shrimp ponds. *Aquaculture* 195, 193-204.
- Tolmasky, M. E. (2000). Bacterial resistance to aminoglycosides and β -lactams: The Tn1331 transposon paradigm. *Frontiers in Biology Science* 5, 20-29.
- Tonguthai, K., Chinabut, S., Somsiri, T., Chanratchakool, P., & Kanchanakhan, S. (1999). Diagnostic procedures for finfish diseases. AAHRI - Aquatic Animal Health Research Institute. Bangkok, Thailand.

Isolation and selection of carotenoid-producing bacteria from marine environment and determination of carotenoid extraction condition

Cuc T. H. Le, Hoa T. M. Le, Trang T. Tran, Vi T. T. Van,
Phong V. Nguyen, & Thanh T. L. Bien*

Faculty of Biological Sciences, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: June 15, 2021

Revised: August 20, 2021

Accepted: September 06, 2021

Keywords

Carotenoid-producing bacteria

Carotenoids

Extraction

Isolation

Marine environment

*Corresponding author

Bien Thi Lan Thanh

Email: bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The carotenoid is a natural pigment group, which is gradual of interest because of its essential biological activities and great production potentials such as using low-cost material and easy to apply on a large scale. For further development of natural carotenoid products, in this study, fourteen yellow, red, and orange pigment-producing marine bacterial strains were isolated from 25 seawater samples collected along coasts of Phu Quoc island (Kien Giang province), Vung Tau City (Ba Ria – Vung Tau province), Can Gio district (Ho Chi Minh city), and Thang Binh district (Quang Nam province). These isolates were identified as belonging to seven genera *Micrococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus* and *Exiguobacterium* with 96.7% - 100% of 16S rRNA sequences identity. Based on carotenoid producing ability and UV-absorbance profile, three of the isolates including *Micrococcus* sp. 64A3a (yellow), *Exiguobacterium* sp. YT09 (orange) and *Rhodococcus enclensis* strain RSA3 (red) were selected for investigation of carotenoid extraction conditions. Methanol at a concentration of 100% with ratio of 1 g bacterial cells/10 mL methanol is suitable conditions for extraction of red, orange and yellow pigments from the isolates.

Cited as: Le, C. T. H., Le, H. T. M., Tran, T. T., Van, V. T. T., Nguyen, P. V., & Bien, T. T. L. (2021). Isolation and selection of carotenoid-producing bacteria from marine environment and determination of carotenoid extraction condition. *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), 53-61.

Phân lập, tuyển chọn các dòng vi khuẩn sinh carotenoid từ môi trường biển và xác định điều kiện ly trích sắc tố

Lê Thị Hoàng Cúc, Lê Thị Mỹ Hoa, Trần Thuỳ Trang, Văn Thị Tường Vi,
Nguyễn Vũ Phong & Biện Thị Lan Thanh*

Khoa Khoa Học Sinh Học, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 15/06/2021

Ngày chỉnh sửa: 20/08/2021

Ngày chấp nhận: 06/09/2021

Từ khóa

Carotenoids

Ly trích

Môi trường biển

Phân lập

Vi khuẩn sinh carotenoid

*Tác giả liên hệ

Biện Thị Lan Thanh

Email: bienthilanthanh@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Carotenoid là một nhóm sắc tố tự nhiên đang dần được quan tâm sản xuất nhờ có nhiều hoạt tính sinh học quan trọng và có tiềm năng lớn trong sản xuất như chi phí nguyên liệu thấp và dễ áp dụng ở quy mô lớn. Trong nghiên cứu này, nhằm hướng tới phát triển các sản phẩm carotenoid từ vi sinh vật, 14 chủng vi khuẩn sinh sắc tố vàng, đỏ và cam đã được phân lập từ 25 mẫu nước biển thu thập tại các vùng biển Tây Nam Bộ (huyện Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang), Đông Nam Bộ (Vũng Tàu và Cần Giờ) và Duyên hải Nam Trung Bộ (huyện Thăng Bình, tỉnh Quảng Nam). Các chủng phân lập được xác định thuộc 7 chi: *Micrococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Exiguobacterium* với độ tương đồng trình tự gene 16S rRNA 96,7% - 100%. Dựa vào khả năng sinh carotenoid và độ hấp thu của sắc tố, 3 chủng *Micrococcus* sp. 64A3a (màu vàng), *Exiguobacterium* sp. YT09 (màu cam) và *Rhodococcus enclensis* strain RSA3 (màu đỏ) được tuyển chọn để khảo sát điều kiện ly trích sắc tố. Các sắc tố đỏ, cam và vàng từ các chủng tuyển chọn được ly trích với hiệu suất cao khi sử dụng dung môi là methanol ở nồng độ 100% với tỉ lệ 1 g tế bào vi khuẩn/10 mL methanol.

1. Đặt Vấn Đề

Carotenoid là một trong những nhóm sắc tố tự nhiên quan trọng, tan trong lipid, có màu từ vàng tới đỏ, với cấu trúc cơ bản bao gồm một tetraterpene với một loạt các liên kết đôi liên hợp. Carotenoid xuất hiện trong hệ thống quang hợp của thực vật bậc cao, tảo và các vi khuẩn. Ở một số vi khuẩn và nấm, carotenoid đóng vai trò là các chất bảo vệ chống lại sự tổn thương bởi quang oxy hóa, bảo vệ khi điều kiện tăng trưởng có ánh sáng và nhiều không khí (Bartley & Scolnik, 1995). Một số carotenoid là tiền chất của vitamin A, và có các hoạt tính như kháng viêm, chống oxy hóa, điều hòa miễn dịch, chống ung thư, dùng cho liệu pháp tim mạch và các bệnh thoái hóa thần kinh (Shahidi & Ambigaipalan, 2015) và chống béo phì (Lai & ctv., 2015).

Mặc dù carotenoid hóa học có dãy màu sắc đa

dạng và chi phí sản xuất thấp nhưng việc sản xuất và sử dụng carotenoid hóa học tạo ra các chất thải có thể gây ra những ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường và sức khỏe con người (Burrows, 2009; Asker & ctv., 2018). Vì vậy sản xuất carotenoid có nguồn gốc từ nguồn thực vật và vi sinh vật dần được quan tâm. Việc sản xuất carotenoid từ thực vật ở quy mô công nghiệp thường phụ thuộc vào yếu tố mùa vụ và thổ nhưỡng. Do đó, sản xuất carotenoid từ vi sinh vật được xem là hướng tiềm năng, đặc biệt là đối với vi sinh vật biển với nhiều ưu điểm như: giảm tạp nhiễm do có thể nuôi cấy trong điều kiện độ mặn cao, dễ sản xuất ở quy mô lớn, sử dụng nguồn cơ chất rẻ tiền, giảm chi phí sản xuất, các điều kiện sản xuất có thể được tối ưu và rút ngắn thời gian (Tinoi & ctv., 2005; Wu & Liu, 2007; Markou & Nerantzis, 2013). Tuy nhiên, ở Việt Nam thông tin và các nghiên cứu về sắc tố từ vi sinh vật còn hạn chế, một số nghiên

cứu được công bố như Huynh & ctv. (2013), Tran & ctv. (2015) và Le & Huynh (2018).

Thực phẩm được bổ sung chất tạo màu sẽ thu hút người tiêu dùng trong việc lựa chọn thực phẩm, nhưng với sự nhận thức ngày càng cao về tính độc hại của màu tổng hợp, nhu cầu về các sắc tố an toàn từ thiên nhiên dần được quan tâm (Arulselvi & ctv., 2014). Vì vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm tuyển chọn một số vi khuẩn có khả năng sinh carotenoid từ môi trường biển.

2. Vật Liệu và Phương Pháp Nghiên Cứu

2.1. Thu mẫu và phân lập vi khuẩn sinh sắc tố từ nước biển

Mẫu nước biển được thu thập tại 3 khu vực: Tây Nam Bộ (huyện Phú Quốc, tỉnh Kiên Giang), Đông Nam Bộ (Vũng Tàu và Cần Giờ), Duyên hải Nam Trung Bộ (huyện Thăng Bình, tỉnh Quảng Nam). Mẫu được thu một cách ngẫu nhiên cách mặt nước khoảng 5 – 10 cm, chứa trong các chai polypropylene và trữ lạnh, vận chuyển về phòng thí nghiệm và phân tích trong vòng 1 – 2 ngày.

Các mẫu nước biển được pha loãng đến nồng độ thích hợp, sau đó 100 μ L dịch pha loãng được trải trên môi trường Nutrient agar (NA), phơi dưới đèn UV bước sóng 253,7 nm (UV-C) trong 3 phút, và ủ ở 30°C trong 5 ngày (Asker, 2017). Các khuẩn lạc có màu vàng, đỏ và cam trên các đĩa môi trường NA được chọn lọc, làm thuần và trữ ở -20°C cho các thí nghiệm tiếp theo.

2.2. Định danh các chủng vi khuẩn sinh sắc tố

Các chủng vi khuẩn tạo sắc tố được định danh dựa trên đặc điểm hình thái khuẩn lạc và tế bào, các phản ứng sinh hóa và giải trình tự vùng gene 16S rRNA.

DNA tổng số của vi khuẩn được ly trích với GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Vùng gene 16S rRNA của vi khuẩn được khuếch đại bằng PCR với cặp universal primer 27F (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') và 1492R (5' GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Lane, 1991). Sản phẩm PCR (khoảng 1500 bp) được kiểm tra trên gel agarose 1% và được gửi giải trình tự. Kết quả giải trình tự được phân tích bằng phần mềm Bioedit và so sánh với dữ liệu trên ngân hàng gene NCBI để xác định loài tương đồng (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

2.3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh carotenoid cao

Các chủng vi khuẩn thuần được tăng sinh trong 50 mL Nutrient broth trong 3 ngày. Dịch vi khuẩn được ly tâm thu tế bào, sau đó rửa tế bào 2 lần với nước cất vô trùng. Thêm methanol (MetOH) vào sinh khối với tỉ lệ 1 g sinh khối/10 mL MetOH, vortex, ủ 60°C trong 5 phút và ly tâm thu dịch trích carotenoid. Độ hấp thu (Abs) của sắc tố từ các chủng vi khuẩn được phân tích với dãy bước sóng từ 300 – 700 nm (Asker & ctv., 2007). Chủng vi khuẩn có giá trị Abs ở $\lambda_{\max}$ cao nhất được chọn cho thí nghiệm tiếp theo.

2.4. Khảo sát các điều kiện ly trích sắc tố từ tế bào vi khuẩn (loại dung môi/nồng độ dung môi và tỷ lệ sinh khối/dung môi)

Các chủng vi khuẩn sinh sắc tố vàng, cam và đỏ có độ hấp thu cao nhất từ thí nghiệm ở mục 2.3 được chọn sử dụng để khảo sát điều kiện ly trích sắc tố. Thí nghiệm được bố trí với 2 yếu tố gồm: nồng độ dung môi (%), và tỷ lệ sinh khối/dung môi (g/mL). Dung môi được sử dụng MetOH trong quá trình trích ly được sử dụng gồm 3 mức nồng độ 50%, 70% và 100%. Lượng MetOH được sử dụng trong các thí nghiệm trích ly được sử dụng theo các mức 1/10, 1/15, 1/20 và 1/25 g/mL trong đó khối lượng của vật liệu trích ly được xem như hằng số và lượng thể tích MetOH được xem như biến số trong quá trình khảo sát. Dung dịch sau ly trích được định mức bằng MetOH về thể tích bằng 25 mL. Tiến hành quét phổ 300 – 700 nm để xác định đỉnh hấp thu ($\lambda_{\max}$) của dung dịch trích ly.

Thí nghiệm được thực hiện với quy trình cùng các thông số đầu vào cố định như kỹ thuật trích ly ngâm dầm ở điều kiện nhiệt độ 60°C trong 5 phút. Mẫu sau trích ly được ly tâm ở điều kiện 6000 vòng/phút và thu dịch nổi. Dịch sau ly tâm được đánh giá cảm quan màu sắc và xác định Abs bằng UV – Vis với thông số $\lambda_{\max}$ và xác định hàm lượng carotenoid tổng số theo công thức biến đổi từ Cunningham & ctv. (2015): $TCC = A \times \frac{V}{m}$.

Trong đó:

TCC là hàm lượng carotenoid tổng số

A là độ hấp thu của sắc tố tại $\lambda_{\max}$

V là thể tích dung môi định mức (mL)

m là khối lượng sinh khối (g)

Các thí nghiệm được lặp lại 3 lần và xử lý thống kê theo mô hình CRD 2 biến ngẫu nhiên hoàn toàn với đáp ứng hàm lượng carotenoid tổng số. Kết quả thí nghiệm nhằm đánh giá mức độ ảnh hưởng có ý nghĩa của 2 yếu tố nồng độ dung môi và tỷ lệ sinh khối dung môi ở mức tin cậy $\alpha = 95\%$. Thông qua mô hình trắc nghiệm phân hạng LSD nhằm tìm được cặp yếu tố có sự tác động có ý nghĩa nhất với đáp ứng hàm lượng carotenoid tổng số (Williams & Abdi, 2010).

3. Kết Quả và Thảo Luận

3.1. Phân lập vi khuẩn sinh sắc tố từ nước biển

Từ 25 mẫu nước biển thu thập ở các vùng biển thuộc tỉnh Bà Rịa – Vũng Tàu, huyện Cần Giờ thành phố Hồ Chí Minh, huyện Thăng Bình tỉnh Quảng Nam và huyện Phú Quốc tỉnh Kiên Giang, 14 chủng vi khuẩn có khả năng sinh sắc tố đã được phân lập trên môi trường NA dưới tác động của tia UV. Các vi khuẩn phân lập có khuẩn lạc màu vàng, cam, đỏ, hình dạng tròn đều, kích thước nhỏ và bờ nhẵn (Hình 1).



Hình 1. Màu sắc khuẩn lạc các chủng vi khuẩn phân lập được.

Các sắc tố được vi sinh vật sinh ra là hợp chất có khả năng hấp thụ tia UV và bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân gây hại (Asker, 2017). Vì vậy phương pháp hiệu quả để loại bỏ những chủng không có khả năng sinh sắc tố là phơi dưới đèn UV 3 phút sau khi cấy trang mẫu trên đĩa thạch.

Môi trường biển từ lâu đã được quan tâm như nguồn tài nguyên sinh học để khai thác các hợp chất có hoạt tính sinh học, trong đó có carotenoid (Hosokawa & ctv., 2009). Năm 2006, Du & ctv. đã phân lập được các chủng vi khuẩn dị dưỡng sinh sắc tố (vàng, đỏ, hồng và cam) trong môi trường nước biển ở miền duyên hải Trung Quốc và Thái Bình Dương. Các chủng vi khuẩn này đã được xác định gồm 25 chi thuộc 6 lớp *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacilli*, *Flavobacteria* và *Sphingobacteria* có tiềm năng sản xuất các sắc tố sinh

học ứng dụng trong nhiều lĩnh vực của đời sống. Ngoài ra, Srilekha & ctv. (2018) đã phân lập được chủng vi khuẩn *Salinicoccus* sp. sinh sắc tố cam từ vùng biển Nellore (Ấn Độ) và chứng minh được khả năng gây độc mạnh tế bào ung thư phổi A549 và tế bào ung thư vú MCF-7. Ở Việt Nam, năm 2020, Bang & ctv. đã phân lập được 54 dòng chủng vi khuẩn thuộc chi *Bacillus* có khả năng tổng hợp carotenoid từ mẫu đất và nước mặn tại huyện Hòn Đất, tỉnh Kiên Giang. Sắc tố từ các chủng này được ly trích với hệ dung môi methanol/chloroform (1/2, v/v) với quang phổ hấp thụ ở bước sóng 400 - 600 nm. Tương tự, nhóm tác giả (Bang & Van, 2020) cũng đã phân lập được 55 dòng vi khuẩn từ các mẫu đất thu ở Núi Cẩm, huyện Tịnh Biên, tỉnh An Giang, có khả năng sinh carotenoid với độ hấp thụ ở bước sóng 400 - 600 nm.

3.2. Định danh các chủng vi khuẩn phân lập

Các đặc điểm về khuẩn lạc và tế bào của các chủng vi khuẩn sinh sắc tố phân lập được quan sát và ghi nhận trong Bảng 1. Tất cả 14 chủng vi khuẩn có khuẩn lạc nhỏ, tròn, nhẵn và có màu cam, đỏ, vàng sau 48 giờ nuôi cấy trên môi trường NA. Kết quả kiểm tra các phản ứng sinh hóa của các chủng vi khuẩn phân lập được trình bày cụ thể trong Bảng 2.

Các chủng vi khuẩn được trích DNA tổng số và khuếch đại vùng 16S rRNA bằng PCR với cặp mồi 27F/1492R. Sản phẩm PCR (khoảng 1500 bp) được giải trình tự và so sánh với trình tự đã biết trên ngân hàng gene NCBI, kết quả được trình bày ở Bảng 3.

Kết quả định danh ở Bảng 3 tương đồng với các đặc điểm hình thái học và thử nghiệm sinh hóa của chủng phân lập. Các chủng đều là vi khuẩn Gram dương, hiếu khí, không sinh bào tử và có thể được tìm thấy ở nhiều môi trường khác nhau như đất, nước ngọt, nước biển, khuẩn lạc nhỏ, tròn, bề mặt nhẵn và có màu. Trong các chủng phân lập, 9 chủng có tế bào hình que và 5 chủng có tế bào hình cầu. Trong đó, chi *Rhodococcus* có hình thái tế bào thay đổi phụ thuộc vào giai đoạn phát triển, một số chủng có thể biến đổi từ hình cầu sang hình que ngắn (Borisova, 2011).

Năm 2012, Jafarzade & ctv. đã phân lập được 55 chủng vi khuẩn có khả năng sinh sắc tố từ bọt biển, nước biển, trầm tích rừng ngập mặn, hải sâm và trai từ các khu vực ven biển khác nhau của Malaysia. Các chủng có các màu cam,

Bảng 1. Đặc điểm khuẩn lạc và tế bào các chủng vi khuẩn sinh sắc tố phân lập từ nước biển

STT	Chủng vi khuẩn	Đặc điểm khuẩn lạc			Đặc điểm khuẩn lạc	
		Bia	Hình dạng	Màu sắc	Gram	Hình dạng
1	V1	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
2	V2	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
3	V3	Nhấn	Tròn	Vàng nhạt	+	Que
4	V4	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
5	V5	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
6	V6	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Tụ cầu
7	V7	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Que
8	V8	Nhấn	Tròn	Vàng đậm	+	Que
9	Đ1	Nhấn	Tròn	Đỏ đậm	+	Que
10	Đ2	Nhấn	Tròn	Đỏ đậm	+	Que
11	C1	Nhấn	Tròn	Cam đậm	+	Que
12	C2	Nhấn	Tròn	Cam đậm	+	Que
13	C3	Nhấn	Tròn	Cam nhạt	+	Que
14	C4	Nhấn	Tròn	Cam nhạt	+	Que

+: phản ứng dương tính.

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm sinh hóa các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Chủng vi khuẩn	Indole	MR/ VP	Citrate	Sinh H ₂ S	Catalase	Oxidase
1	V1	-	-/-	-	-	+	+
2	V2	-	-/-	-	-	+	+
3	V3	-	+/-	-	-	+	-
4	V4	-	-/-	-	-	+	-
5	V5	-	-/-	-	-	+	-
6	V6	-	-/-	-	-	+	-
7	V7	-	-/-	-	-	+	-
8	V8	-	-/-	-	-	+	-
9	Đ1	-	-/-	-	-	+	-
10	Đ2	-	-/-	-	-	+	-
11	C1	-	+/-	-	-	+	+
12	C2	-	+/-	-	-	+	+
13	C3	-	+/-	-	-	+	-
14	C4	-	-/-	+	-	+	-

+: phản ứng dương tính; -: phản ứng âm tính.

vàng, đỏ, hồng, xanh và tím, trong đó 18 chủng có khả năng kháng khuẩn thuộc 2 chi *Serratia* và *Zooshikella*. Leiva & ctv. (2015) đã phân lập được các chủng vi khuẩn sinh carotenoid thuộc 11 chi *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Brachybacterium*, *Citricoccus*, *Kocuria*, *Labedella*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Rhodococcus*, *Salinibacterium*, *Sanguibacter* và *Staphylococcus* từ bề mặt tảo tại Quần đảo Nam Shetland. Các chủng này đều là vi khuẩn Gram dương và có khả năng sinh sắc tố, trong đó có 5 chủng thể hiện khả năng kháng một số chủng vi khuẩn liên quan đến rong biển.

Năm 2020, từ 54 dòng vi khuẩn phân lập từ các mẫu đất và nước mặn thu ở Hòn Đất

(Kiên Giang) Bang & ctv. đã xác định được 2 dòng vi khuẩn có khả năng sinh carotenoid cao nhất có trình tự gene 16S rDNA tương đồng 100% với *Bacillus marisflavi* IHBB 9971 và *Bacillus infantis* BAB-2130. Ngoài ra, Bang & Van (2020) cũng đã xác định được 10 chủng có hàm lượng carotenoid tổng số cao từ 2,41 - 3,4 µg/mL từ 55 chủng vi khuẩn sinh carotenoid phân lập từ các mẫu đất thu tại Núi Cẩm, tỉnh An Giang. Các chủng này thuộc các chi *Corynebacterium*, *Exiguobacterium*, *Geobacillus*, *Serratia*, *Stenotrophomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Kocuria*, *Brevundimonas*. Nhiều loài sinh vật trong đó có vi khuẩn có

xu hướng tích lũy carotenoid dưới các điều kiện stress sinh học và phi sinh học thông qua quá trình điều hòa tăng các con đường sinh tổng hợp carotenoid như là phản ứng tự vệ tránh thiệt hại (Ram & ctv., 2020).

3.3. Tuyển chọn các chủng vi khuẩn có khả năng sinh carotenoid cao

Carotenoid từ các chủng vi khuẩn phân lập được ly trích cùng một điều kiện. Dịch ly trích được đo độ hấp thu trong dãy bước sóng từ 300 – 700 nm. Kết quả tuyển chọn được 3 chủng vi khuẩn sinh sắc tố vàng, đỏ và cam có độ hấp thu lớn nhất ở $\lambda_{\max}$ (Bảng 4). Đối với sắc tố vàng, độ hấp thu dao động từ 0,19 - 0,75 ở $\lambda_{\max}$ 438 – 439 nm. Trong đó, sắc tố từ chủng V1 ($\lambda_{\max}$ = 439 nm) có độ hấp thu cao nhất là 0,75, khác biệt có ý nghĩa so với các chủng còn lại.

Bảng 4. Độ hấp thu của dịch ly trích từ các chủng vi khuẩn phân lập

Chủng vi khuẩn	$\lambda_{\max}$ (nm)	Độ hấp thu
Sắc tố vàng	V1	0,75 ^a ± 0,05
	V2	0,19 ^c ± 0,12
	V3	0,28 ^{bc} ± 0,02
	V4	0,25 ^{bc} ± 0,13
	V5	0,20 ^c ± 0,02
	V6	0,47 ^b ± 0,14
	V7	0,47 ^b ± 0,08
	V8	0,25 ^{bc} ± 0,02
Sắc tố vàng	D1	0,70 ^a ± 0,04
	D2	0,47 ^b ± 0,03
Sắc tố cam	C1	0,42 ^a ± 0,04
	C2	0,24 ^b ± 0,11
	C3	0,24 ^b ± 0,05
	C4	0,24 ^b ± 0,04

a-c Theo từng sắc tố, các chữ cái khác nhau theo sau các giá trị trung bình thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở mức $P \leq 0,05$.

Sắc tố đỏ từ 2 chủng vi khuẩn phân lập được có độ hấp thu 0,47 – 0,70 ở $\lambda_{\max}$ 475 nm. Trong đó, chủng D1 có độ hấp thu cao nhất là 0,70, khác biệt có ý nghĩa so với chủng D2. Đối với sắc tố cam, độ hấp thu của sắc tố từ các chủng C1, C2, C3 và C4 dao động trong khoảng 0,24 - 0,42 ở $\lambda_{\max}$ từ 452 - 467 nm. Trong đó, chủng C1 có độ hấp thu cao nhất là 0,42 với $\lambda_{\max}$ = 467 nm, khác biệt có ý nghĩa so với các chủng còn lại.

Kết quả trên phù hợp với công bố trước đây của Mohana & ctv. (2013), các sắc tố được ly

Bảng 3. Kết quả định danh các chủng vi khuẩn phân lập

STT	Chủng vi khuẩn	Loại tương đồng	Độ tương đồng (%)	Accession number
1	V1	<i>Micrococcus</i> sp. 64A3a	96,66	KJ743999.1
2	V2	<i>Micrococcus</i> sp. HB-1	97,78	GU073283.1
3	V3	<i>Microbacterium lacus</i> strain SP-04	99,25	KX082876.1
4	V4	<i>Micrococcus</i> sp. DUT_AHX	100	DQ409081.1
5	V5	<i>Kocuria</i> sp. XJ7DR4	100	AB773222.1
6	V6	<i>Micrococcus</i> sp. PA-E028	98,94	FJ233852.1
7	V7	<i>Bacillus</i> sp. ROIS-10	97,07	KJ413088.1
8	V8	<i>Brevibacterium luteolum</i> strain KS-1	99,78	JX535359.1
9	D1	<i>Rhodococcus encensis</i> strain RSA3	99,48	MH384434.1
10	D2	<i>Rhodococcus</i> sp. CCB AU 10970	97,24	JF772580.1
11	C1	<i>Erigobacterium</i> sp. YT09	100	JX274652.1
12	C2	<i>Erigobacterium profundum</i> strain YH5	99,93	KM873375.1
13	C3	<i>Brevibacterium</i> sp. strain MCS	99,93	MF431777.1
14	C4	<i>Brevibacterium linens</i> strain BS258	100	CP014869.1

Bảng 5. Hàm lượng carotenoid tổng số ở các điều kiện trích ly khác nhau

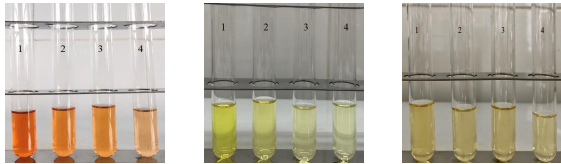
Tỷ lệ nguyên liệu dung môi (g/mL)	Nồng độ dung môi (%)											
	Chủng C1				Chủng V1				Chủng Đ1			
	100	70	50	100	70	50	100	70	50	100	70	50
1/10	9,41 ^a ±	2,12 ^e ±	3,07 ^{de} ±	21,74 ^a ±	7,52 ^{bc} ±	4,36 ^{bcd} ±	21,76 ^a ±	3,58 ^{cd} ±	4,92 ^{cd} ±	21,76 ^a ±	3,58 ^{cd} ±	4,92 ^{cd} ±
	0,45 ±	0,34 ±	1,51 ±	2,10 ±	0,43 ±	0,49 ±	5,70 ±	0,34 ±	1,38 ±	5,70 ±	0,34 ±	1,38 ±
1/15	6,76 ^b ±	1,76 ^e ±	1,84 ^e ±	7,84 ^b ±	4,02 ^{bcd} ±	2,94 ^d ±	14,91 ^{ab} ±	1,93 ^{cd} ±	5,11 ^{cd} ±	14,91 ^{ab} ±	1,93 ^{cd} ±	5,11 ^{cd} ±
	1,24 ±	0,17 ±	0,40 ±	3,31 ±	0,83 ±	1,06 ±	4,44 ±	1,50 ±	2,11 ±	4,44 ±	1,50 ±	2,11 ±
1/20	5,72 ^{bc} ±	2,38 ^e ±	2,69 ^{de} ±	5,41 ^{bcd} ±	2,53 ^d ±	4,16 ^{bcd} ±	10,40 ^{bc} ±	1,17 ^d ±	4,90 ^{cd} ±	10,40 ^{bc} ±	1,17 ^d ±	4,90 ^{cd} ±
	0,40 ±	0,70 ±	0,82 ±	1,16 ±	0,73 ±	0,50 ±	5,45 ±	0,30 ±	0,32 ±	5,45 ±	0,30 ±	0,32 ±
1/25	4,60 ^{cd} ±	3,13 ^{de} ±	1,16 ^e ±	3,60 ^{cd} ±	3,55 ^{cd} ±	4,57 ^{bcd} ±	10,35 ^{bc} ±	3,04 ^{cd} ±	3,83 ^{cd} ±	10,35 ^{bc} ±	3,04 ^{cd} ±	3,83 ^{cd} ±
	0,59 ±	0,33 ±	0,10 ±	1,42 ±	1,08 ±	0,91 ±	3,06 ±	0,81 ±	1,56 ±	3,06 ±	0,81 ±	1,56 ±

^{a-e}Các trung bình có chữ cái khác nhau trong cùng một hàng chỉ sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở $P < 0,05$.

trích từ 2 loài *Micrococcus roseus* và *Micrococcus luteus* sinh sắc tố màu đỏ và vàng với độ hấp thụ cực đại được quan sát lần lượt ở bước sóng 476,31 và 437,16 nm. Các sắc tố này được xác định là carotenoid. Trong thí nghiệm này, 3 chủng V1, Đ1 và C1 có độ hấp thụ cao nhất ở λ_{max} lần lượt là 439 nm, 475 nm và 467 nm. Theo Vu & ctv. (2011), dịch chiết sắc tố từ vi khuẩn có đỉnh hấp thụ trong vùng bước sóng từ 400 nm đến 600 nm là dãy phổ hấp thụ của carotenoid.

3.4. Khảo sát điều kiện ly trích sắc tố từ tế bào vi khuẩn

Sắc tố carotenoid được ly trích với dung môi MetOH với các nồng độ và tỉ lệ sinh khối/dung môi khác nhau. Sau khi định mức thể tích bằng 25 mL, dịch chiết sắc tố từ các chủng C1, V1 và Đ1 được đo độ hấp thụ ở các bước sóng lần lượt là 467 nm, 439 nm và 475 nm. Kết quả ly trích được trình bày ở Bảng 5. Hiệu quả ly trích sắc tố tương ứng với hàm lượng carotenoid tổng số đối với cả 3 chủng C1, V1 và Đ1 đều đạt cao nhất khi nồng độ MetOH 100% và tỷ lệ sinh khối/dung môi là 1/10 g/mL. Khi ly trích ở điều kiện trên, sắc tố màu cam từ chủng C1 và màu vàng từ chủng V1 có hàm lượng carotenoid tổng số cao nhất lần lượt là 9,41 và 21,74. Riêng chủng Đ1, hiệu quả ly trích sắc tố không khác biệt có ý nghĩa giữa tỷ lệ dung môi 1/10 g/mL và 1/15 g/mL. Tuy nhiên, xét về cảm quan màu sắc khi ly trích ở hai tỷ lệ này thì có sự khác biệt rõ rệt, màu sắc của dịch ly trích ở tỷ lệ 1/10 g/mL đậm hơn so với tỷ lệ 1/15 g/mL (Hình 2A). Theo Downham & Collins (2000), màu sắc đóng vai trò rất quan trọng và ảnh hưởng đến cảm quan, chất lượng cũng như giá thành của sản phẩm. Vì vậy, ly trích sắc tố đỏ từ chủng vi khuẩn Đ1 với nồng độ MetOH là 100% và tỷ lệ sinh khối dung môi 1/10 g/mL được xem như là điều kiện ly trích cho hiệu quả cao nhất trong điều kiện thí nghiệm.



(A) Chủng Đ1 (B) Chủng V1 (C) Chủng C1

Hình 2. Dịch ly trích sắc tố với MetOH 100% với 4 tỷ lệ 1/10, 1/15, 1/20 và 1/25 (g/mL) tương ứng với các ống nghiệm 1, 2, 3 và 4.

Theo Stafnes & ctv. (2010), MetOH cho hiệu suất chiết carotenoid tổng số tốt nhất so với các dung môi khác. Trong nghiên cứu này, carotenoid từ cả 3 chủng vi khuẩn tuyển chọn đều được ly trích hiệu quả nhất ở nồng độ MetOH 100%. Điều này là do khi trộn lẫn MetOH và nước với những tỷ lệ khác nhau thì các hỗn hợp này có độ phân cực khác nhau, nồng độ dung môi có độ phân cực tương đương với hợp chất được trích ly sẽ hòa tan chất đó tốt hơn (Martin & ctv., 1985).

4. Kết Luận

Từ 25 mẫu nước biển đã phân lập được 14 chủng vi khuẩn sinh sắc tố carotenoid trong đó có 8 chủng sinh sắc tố màu vàng, 2 chủng sinh màu đỏ và 4 chủng sinh màu cam. Các chủng phân lập thuộc 7 chi *Micrococcus*, *Kocuria*, *Microbacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Rhodococcus*, *Exiguobacterium*. Ba chủng *Micrococcus* sp. 64A3a (màu vàng), *Exiguobacterium* sp. YT09 (màu cam) và *Rhodococcus* enclensis strain RSA3 (màu đỏ) có khả năng sinh carotenoid với độ hấp thu lần lượt là 0,75, 0,70 và 0,42 được tuyển chọn để khảo sát điều kiện ly trích sắc tố. Sắc tố carotenoid từ các chủng vi khuẩn tuyển chọn được ly trích với hiệu suất cao khi sử dụng MetOH 100% với tỉ lệ sinh khối/dung môi là 1/10 g/mL.

Lời Cam Đoan

Chúng tôi cam đoan bài báo do nhóm tác giả thực hiện và không có mâu thuẫn nào.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu này là một phần của đề tài khoa học và công nghệ cấp cơ sở mã số CS-SV20-CNSH-02 được cấp kinh phí bởi Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Arulselvi, I. P., Umamaheswari, S., Sharma, R. G., Kartik, C., & Jayakrishna, C. (2014). Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. *Journal of Food Processing and Technology* 5(1), 292.
- Asker, D. (2017). Isolation and characterization of a novel, highly selective astaxanthin-producing marine bacterium. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65, 9101-9109.
- Asker, D., Awad, S. T., Beppu, T., & Ueda, K. (2018). Rapid and selective screening method for isolation and identification of carotenoid-producing bacteria. *Microbial Carotenoids* 1825,143-170.
- Asker, D., Beppu, T., & Ueda, K. (2007). Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(2), 383-392.
- Bang, H. L., & Van, V. L. (2020). Isolation and selection of carotenoid-biosynthesis bacteria strains from Cam mountain, Tinh Bien district, An Giang province. *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology* 8(117), 157-162.
- Bang, H. L., Huynh, T. H. T., Nguyen, L. T. D., & Nguyen, M. C. (2020). Isolation and selection of carotenoid-biosynthesis *Bacillus* spp. from the Coastal zone of Hon Dat district, Kien Giang province. *Journal of Vietnam Agricultural Science and Technology* 2(111),85-89.
- Bartley, G. E., & Scolnik, P. A. (1995). Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *The Plant Cell* 7(7), 1027-1038.
- Borisova, R. B. (2011). *Isolation of a Rhodococcus soil bacterium that produces a strong antibacterial compound* (Unpublished master's thesis). East Tennessee State University, Tennessee, USA.
- Burrows, A. (2009). Palette of our palates: a brief history of food coloring and its regulation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 8(4), 394-408.
- Cunningham, W. C., Capar, S. G., & Mindak, W. R. (2015). *Elemental analysis manual for food and related products (section 3.4 special calculations)*. Retrieved May 1, 2021, from <https://www.fda.gov/media/89649/download>.
- Downham A., & Collins P. (2000). Colouring our foods in the last and next millennium. *Institute of Journal Food Science Technology* 35(1), 5-22.
- Du, H., Jiao, N., Hu, Y., & Zeng, Y. (2006). Diversity and distribution of pigmented heterotrophic bacteria in marine environments. *FEMS Microbiology Ecology* 57(1), 92-105.
- Hosokawa, M., Okada, T., Mikami, N., Konishi, I., & Miyashita, K. (2009). Bio-functions of marine carotenoids. *Food Science and Biotechnology* 18(1), 1-11.
- Huynh, H. H., Le, T. T. L., Nguyen, T. M. L., Le, T. M. P., & Pham, T. H. (2013). Investigation of beta-carotene production from microalgae *Dunaliella* isolated in Vietnam. *Science & Technology Development* 16(1), 43-50.
- Jafarzade, M., Yahya, N. A., Mohamad, S., Usup, G., & Ahmad, A. (2012). Isolation and characterization of pigmented bacteria showing antimicrobial activity from Malaysian marine environment. *Malaysian Journal of Microbiology* 9(2), 152-160.

- Lai, C. S., Wu, J. C., & Pan, M. H. (2015). Molecular mechanism on functional food bioactives for antiobesity. *Current Opinion in Food Science* 2, 9-13.
- Le, B. T., & Huynh, K. Y. (2018). Isolation of some trophic marine microalgae lines capable of producing carotenoids in Ca Mau waters. *Cuu Long University Journal of Sciences* 10, 90-96.
- Leiva, S., Alvarado, P., Huang, Y., Wang, J., & Garrido, I. (2015). Diversity of pigmented Gram-positive bacteria associated with marine macroalgae from Antarctica. *FEMS Microbiology Letters* 362(24), fnv206.
- Markou, G., & Nerantzis, E. (2013). Microalgae for high-value compounds and biofuels production: A review with focus on cultivation under stress conditions. *Biotechnology Advance* 31(8), 1532-1542.
- Martin, A., Wu, P. L., Liron, Z., & Cohen, S. (1985). Dependence of solute solubility parameters on solvent polarity. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 74(6), 638-642.
- Mohana, D. C., Thippeswamy, S., & Abhishek, R. U. (2013). Antioxidant, antibacterial, and ultraviolet-protective properties of carotenoids isolated from *Micrococcus* spp. *Radiation Protection and Environment* 36(4), 168-174.
- Ram, S., Mitra, M., Shah, F., Tirkey, S. R., & Mishra, S. (2020). Bacteria as an alternate biofactory for carotenoid production: A review of its applications, opportunities and challenges. *Journal of Functional Foods* 67, 103867.
- Shahidi F., & Ambigaipalan P. (2015). Novel functional food ingredients from marine sources. *Current Opinion in Food Science* 2, 123-129.
- Srilekha, V., Krishna, G., Mahender, P., & Charya, M. S. (2018). Investigation of in vitro cytotoxic activity of pigment extracted from *Salinococcus* sp. isolated from Nellore sea coast. *Journal of Marine Medical Society* 20(1), 31.
- Stafsnes, M. H., Josefsen, K. D., Kildahl-Andersen, G., Valla, S., Ellingsen, T. E., & Bruheim, P. (2010). Isolation and characterization of marine pigmented bacteria from Norwegian coastal waters and screening for carotenoids with UVA-blue light absorbing properties. *The Journal of Microbiology* 48(1), 16-23.
- Tinoi, J., Rakariyatham, N., & Deming, R. L. (2005). Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry* 40(7), 2551-2557.
- Tran, T. X. M., Nguyen, T. P., Nguyen, T. L., & Nguyen, V. B. (2015). Isolation and identification of thraustochytrid heterotrophic microalga for production of carotenoids. *Can Tho University Journal of Science* 37(1), 57-64.
- Vu, T. T., Tran, H. T., Tran, T. D., & Tran, C. D. (2011). Investigation of Carotenoid formation over time in the vegetative phase of some *Bacillus* strains. *Ho Chi Minh City Medical Journal* 15(1), 211-217.
- Williams, L. J., & Abdi, H. (2010). Fisher's least significant difference (LSD) test. *Encyclopedia of Research Design* 218, 840-853.
- Wu, J. Y., & Liu, Y. S. (2007). Optimization of cell growth and carotenoid production in *Xanthophyllomyces dendrorhous* through statistical experiment design. *Biochemical Engineering Journal* 36(2), 182-189.

Survey of lighting systems and aesthetic illumination design for various major parks in Ho Chi Minh City

Thuy T. Vuong*, Tien T. M. Duong, Nguyen N. M. Vo, Nghia T. Dang,
Khanh T. Nguyen, & Truong X. Ha

Faculty of Environment and Natural Resources, Nong Lam University, Ho Chi Minh City, Vietnam

ARTICLE INFO

Research Paper

Received: June 29, 2021

Revised: August 19, 2021

Accepted: August 27, 2021

Keywords

Aesthetic illumination design

Lighting system

Public lighting

Urban park

*Corresponding author

Vuong Thi Thuy

Email: vuongthuy@hcmuaf.edu.vn

ABSTRACT

The study was carried out from August 2019 to August 2020 at five major parks in Ho Chi Minh City. We aimed to survey the lighting system including bulb types, lamp types, illumination type, and average horizontal illuminance. The study was carried out by several methods such as a questionnaire of the characteristics of the lamp, observing, measuring, analyzing, synthesizing data, and evaluating. We divided each park by area, for example, main gate, side gate, main axis, branch road, lawn, activity area for investigation. The result showed that popular LED and HQ Compact bulbs of the parks were chandeliers. Most parks had direct lighting to provide panoramic illumination, but they did not reach the average horizontal illuminance. We proposed an aesthetic illumination design for the central area of the park with ideas from the history of the park's formation and development. Briefly, the research results could contribute to the improvement of the lighting system for the parks in Ho Chi Minh City.

Cited as: Vuong, T. T., Duong, T. T. M., Vo, N. N. M., Dang, N. T., Nguyen, K. T. & Ha, T. X. (2021). Survey of lighting systems and aesthetic illumination design for various major parks in Ho Chi Minh City. *The Journal of Agriculture and Development* 20(5), [62-74](#).

Khảo sát hiện trạng hệ thống chiếu sáng và thiết kế ánh sáng nghệ thuật cho năm công viên trọng điểm tại Thành phố Hồ Chí Minh

Vương Thị Thủy*, Dương Thị Mỹ Tiên, Võ Nguyễn Minh Nguyên, Đặng Thành Nghĩa, Nguyễn Tuấn Khanh & Hà Xuân Trường

Khoa Môi Trường và Tài Nguyên, Trường Đại Học Nông Lâm TP.HCM, TP. Hồ Chí Minh

THÔNG TIN BÀI BÁO

Bài báo khoa học

Ngày nhận: 29/06/2021

Ngày chỉnh sửa: 19/08/2021

Ngày chấp nhận: 27/08/2021

Từ khóa

Công viên đô thị

Chiếu sáng công cộng

Hệ thống chiếu sáng

Thiết kế chiếu sáng nghệ thuật

*Tác giả liên hệ

Vương Thị Thủy

Email: vuongthuy@hcmuaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 8/2019 đến tháng 8/2020 tại năm công viên trọng điểm ở TP.HCM. Khảo sát hệ thống chiếu sáng của các công viên trên gồm: loại bóng đèn, loại đèn, kiểu chiếu sáng và độ rọi ngang trung bình. Đề tài được thực hiện bằng một số phương pháp như: sử dụng bảng khảo sát được thiết kế sẵn, quan sát, đo đếm, phân tích, tổng hợp số liệu và đánh giá. Mỗi công viên chia theo khu vực: Cổng chính, cổng phụ, trục chính, đường nhánh, bồn hoa thảm cỏ, khu vực hoạt động ngoài để điều tra. Kết quả đã khảo sát 5 công viên sử dụng bóng LED và HQ Compact, loại đèn chùm được ưa chuộng, đa số công viên chỉ áp dụng kiểu chiếu sáng trực tiếp cung cấp ánh sáng toàn cảnh để nhìn rõ sự vật, tất cả các khu vực ở mỗi công viên đều không đạt độ rọi ngang trung bình theo quy định. Đề tài đã đề xuất thiết kế chiếu sáng nghệ thuật cho khu trung tâm của công viên, lấy ý tưởng từ lịch sử hình thành và phát triển của công viên. Kết quả nghiên cứu đóng góp vào việc cải tạo hệ thống chiếu sáng cho 5 công viên tại Thành phố Hồ Chí Minh.

1. Đặt Vấn Đề

Đèn đường là một tính năng không thể thiếu đối với cảnh quan ban đêm của các đô thị, giúp cư dân trong đô thị thoải mái, phòng chống tội phạm và tăng cường nhận thức về an toàn cá nhân (Beccali & ctv., 2017). Ngoài ra, còn khả năng cải thiện diện mạo của môi trường đô thị và giúp tăng sức hấp dẫn của một đô thị (Seshadri, 1997) và là một công cụ quan trọng để nâng cao cảnh đêm đô thị (Edensor, 2012; Cai & ctv., 2013).

Màu sắc và ánh sáng có thể có tác động đến nhận thức và phản ứng với môi trường của con người (Birren, 1978). Ánh sáng tạo nên những địa điểm hấp dẫn mà mọi người muốn ghé thăm (Boyce, 2019), chiếu sáng không gian ngoài trời ví dụ như một khu vườn giúp tạo ra một góc nhìn mới mẻ hơn so với ban ngày dưới ánh sáng tự nhiên (Moyer, 2005), ánh sáng đèn có thể tôn lên vẻ đẹp của một địa điểm như tòa nhà, đài kỷ

niệm hoặc cầu (Edensor, 2015; SOLAL, 2016). Con người hướng đến mục tiêu an toàn và kích thích, chiếu sáng vào ban đêm hướng đến mục tiêu này, chiếu sáng vào ban đêm là để giải trí và kích thích (Boyce, 2019). Trong các lễ hội ánh sáng nghệ sĩ sử dụng công cụ ánh sáng để khám phá những điều kỳ diệu của nhận thức thị giác, đây là một hình thức kinh doanh phổ biến ở các đô thị lớn (Giordano & Ong, 2017). Ánh sáng nếu được thiết kế phù hợp, có thể góp phần tạo nên tính lịch sử, thẩm mỹ, phát triển đô thị và điều chỉnh lại không gian đô thị cũng như tái tạo đô thị thông qua nhận thức về các yếu tố đặc trưng của đô thị đó (Cucchiella & ctv., 2017). Việc thiết kế chiếu sáng hợp lý gợi lên tính đặc trưng, nâng cao các đặc điểm kiến trúc và cảnh quan của một khu vực (Valetti & ctv., 2019).

Thực tiễn thiết kế chiếu sáng đã trải qua một quá trình phát triển nhiều năm, là kết quả của tiến bộ công nghệ và các hiện tượng văn hóa và xã hội (Mansfield, 2018). Những năm 1980, quan

điểm chức năng của chiếu sáng công cộng được phổ biến rộng rãi và chỉ liên quan đến chiếu sáng đường phố, để đảm bảo duy trì mức độ an toàn tối thiểu. Quan điểm này ngăn cản sự phát triển thiết kế ánh sáng về đêm của các thành phố. Vào những năm 1980, lần đầu tiên ở Pháp và dần dần ở phần còn lại của Châu Âu, khái niệm chiếu sáng nhân tạo bắt đầu vượt ra khỏi giới hạn của chiếu sáng đường phố để trở thành một vấn đề văn hóa (Jankowski, 1993). Khái niệm “chiếu sáng đô thị”, nhằm đáp ứng các yêu cầu định tính cũng như định lượng đã ra đời. Cách tiếp cận ban đầu chỉ giới hạn trong việc chiếu sáng các yếu tố quan trọng nhất của đô thị như các điểm nhấn kiến trúc (Tural & Yener, 2016). Sau này, cùng với sự phát triển của các đô thị, nhu cầu cải thiện chất lượng của không gian đô thị dẫn đến việc nghiên cứu các chức năng chiếu sáng liên kết chặt chẽ với quy hoạch đô thị (Narboni, 1995; Masbouni, 2003).

Việc thiết kế chiếu sáng phải được thực hiện theo các quy định, các yêu cầu và tiêu chuẩn an toàn. Hiện tại, ở cấp độ quốc tế áp dụng tiêu chuẩn CIE 115 (ICOI, 2010), ở các nước Châu Âu là tiêu chuẩn EN 13201 (ECFS, 2015) và ở Ý là UNI Tiêu chuẩn 11248 (ENIU, 2016). Tại Việt Nam, tiêu chuẩn chiếu sáng quốc gia về các công trình hạ tầng kỹ thuật, trong đó có công viên quy chuẩn TCXDVN-333: 2005 và quy chuẩn QCVN 07-7:2016/BXD (MOC, 2016). Hai tiêu chuẩn trên đã quy định về tiêu chuẩn chiếu sáng công viên phải đảm bảo độ rọi ngang trung bình theo quy định, đèn chiếu sáng phải phù hợp về loại bóng, loại đèn. Tại Tp. Hồ Chí Minh, đã có các công viên được xây dựng sau năm 1975, hệ thống chiếu sáng hầu như chỉ có chiếu sáng thông dụng, chiếu sáng nghệ thuật chưa được đầu tư. Cần có nghiên cứu khảo sát hệ thống chiếu sáng và thiết kế ánh sáng nghệ thuật cho các công viên nhằm tăng tính an toàn và thẩm mỹ về đêm.

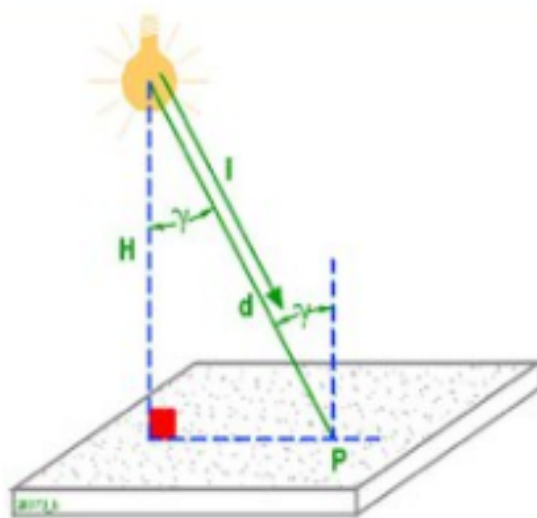
2. Vật Liệu Và Phương Pháp Nghiên Cứu

Phương pháp khảo sát thực địa: Nhằm tìm hiểu hiện trạng hệ thống chiếu sáng của 5 công viên Lê Văn Tám, Lê Thị Riêng, Tao Đàn, Gia Định, 23/9, đề tài đã sử dụng bảng khảo sát được thiết kế sẵn. Bảng khảo sát sẽ được thiết kế gồm 2 phần: Mở đầu – thông tin công viên; Phần thông tin chính yếu về từng loại đèn trong công viên. Nhóm nghiên cứu sử dụng bản đồ của TP. Hồ Chí Minh kết hợp với thông tin về các công viên hiện

có để phân vùng khảo sát theo từng công viên. Một đợt khảo sát sơ bộ để kiểm tra lại vị trí công viên, ước lượng diện tích từng khu vực trong công viên. Dựa theo thông tin ở bước 2, tiến hành phân khu thành 7 khu vực theo TCXDVN 333: 2005 cho mỗi công viên bao gồm: Cổng chính, cổng phụ, trục chính, đường nhánh, khu hoạt động ngoài trời, bồn hoa thảm cỏ và điểm nhấn kiến trúc.

Phương pháp quan sát: Thu thập dữ liệu về loại bóng đèn, loại đèn, kiểu chiếu sáng. Chụp và ghi chú số hiệu ảnh, mã hóa số hiệu ảnh trong phiếu điều tra để thuận tiện trong đánh giá và so sánh.

Phương pháp tính độ rọi ngang trung bình: Sử dụng máy Testo 540 để đo cường độ chiếu sáng (I), mỗi khu vực trong công viên thiết lập lưới đo, mỗi mắt lưới có kích thước 2 m x 2 m, điểm đo là điểm giao giữa chiều dọc và chiều ngang của lưới. Kết quả đo có n cường độ chiếu sáng tại n điểm đo là I(1), I(2),..., I(n) từ đó tính được độ rọi ngang tương ứng E(1), E(2),..., E(n) theo công thức: $E_n = (I_n \times \cos \alpha) / h^2$ (trong đó: I là cường độ chiếu sáng tại điểm n đo bằng máy đo ánh sáng Testo 540; $h = d \cos \alpha$) (Hình 1). Độ rọi ngang trung bình của một khu vực trong công viên là trung bình độ rọi ngang của n điểm đo: $E(TB) = (E(1) + E(2) + \dots + E(n)) / n$.



Hình 1. Độ rọi ngang.

Phương pháp tính số lượng đèn theo quang thông theo TCXDVN 333: 2005: Lượng quang thông cần thiết phát ra từ các bộ đèn được phân bố trên bề mặt của công trình để đạt được độ rọi

trung bình cần thiết trên bề mặt công trình theo công thức: $F_1 = \frac{AE}{UF \times MF}$. Số lượng bộ đèn cần sử dụng được tính theo công thức: $N = \frac{F_t}{F_{bd}}$.

Trong đó:

F_t : tổng lượng quang thông cần thiết của các bóng đèn (lm).

F_{bd} : quang thông của một bóng đèn, giá trị quang thông tại phụ lục 9 TCXDVN 333: 2005.

A: diện tích bề mặt công trình cần chiếu sáng (m^2).

E: độ rọi trung bình cần đạt theo quy định của TCXDVN 333: 2005.

UF: hệ số sử dụng quang thông, thông thường $UF = 0,35$ đến $0,5$. Nghiên cứu sử dụng giá trị $UF = 0,4$

MF: hệ số duy trì chung, trong nghiên cứu sử dụng giá trị $MF = 0,7$ do công viên là khu vực có bụi trung bình.

N: số bộ đèn cần thiết sử dụng (làm tròn lên).

Phương pháp tra cứu thông tin đèn: Tra cứu dữ liệu về các thông số kỹ thuật của đèn như loại bóng đèn, loại đèn và một số thông tin khác mà nhà sản xuất đã khuyến nghị cho việc sử dụng đèn.

Phương pháp tổng hợp số liệu: Dữ liệu sau khi thu thập, được tổng hợp trên phần mềm Microsoft Excel để phân tích, vẽ biểu đồ và thống kê.

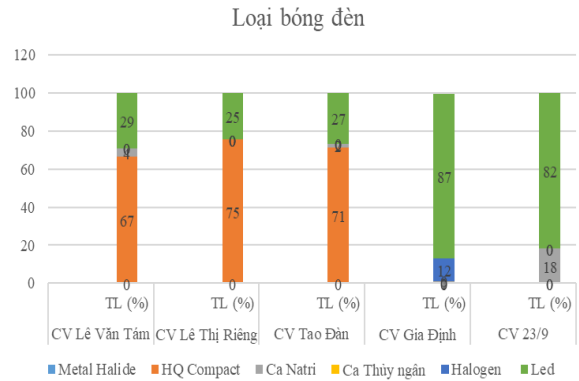
Phương pháp thiết kế: Sử dụng các phần mềm thiết kế như: AutoCAD, Sketchup, Lumion và Photoshop để thiết kế chiếu sáng nghệ thuật cho các công viên.

3. Kết Quả Và Thảo Luận

3.1. Loại bóng đèn

Đề tài khảo sát được tổng 1.481 bóng tại 5 công viên, trong đó công viên Lê Văn Tám có 260 bóng, công viên Lê Thị Riêng có 114 bóng, công viên Tao Đàn 369 bóng, công viên Gia Định 396 bóng và công viên 23/9 342 bóng (Bảng 4). Nhìn chung các công viên phổ biến đèn LED (56%), kế đến là đèn HQ Compact (35%), đèn CA Natri và đèn Halogen chỉ chiếm tỷ lệ nhỏ (6% và 3%) (Hình 2).

Đèn Led mặc dù không được quy định áp dụng tại TCXDVN 333: 2005 nhưng có số lượng nhiều



Hình 2. Biểu đồ tỷ lệ loại bóng đèn.

nhất vì hiệu quả tiết kiệm điện năng, có nhiều mẫu mã và là loại bóng ưa chuộng những năm gần đây. Công viên Gia Định và Công viên 23/9 sử dụng chủ yếu bóng Led để chiếu sáng (chiếm 87% và 82%), 3 công viên còn lại sử dụng bóng Led với tỷ lệ ít hơn (25%, 27% và 29%).

Đèn HQ Compact được quy định chiếu sáng cho công viên theo TCXDVN 333: 2005 hiện được sử dụng rộng rãi tại 3 công viên Lê Văn Tám, Lê Thị Riêng và Tao Đàn (chiếm 67%, 75% và 71%), 2 công viên còn lại không sử dụng bóng HQ Compact để chiếu sáng. Tuy nhiên, đèn Compact có nhược điểm độ sáng không ổn định và độ sáng có thể giảm dần theo thời gian, đồng thời tính độc hại của đèn do thủy ngân hoặc kim loại nặng cũng cần được lưu ý.

Đèn CA Natri và Halogen mặc dù được quy định trong TCXDVN 333: 2005 nhưng hiện nay các công viên áp dụng rất ít. Đèn CA Natri công viên Lê Văn Tám chiếm 4%, công viên Lê Thị Riêng không áp dụng, công viên Tao Đàn 2%, công viên Gia Định 1% và công viên 23/9 18%; Đèn Halogen công viên Gia Định áp dụng (12%). Hai loại đèn CA Thủy ngân và Metal Halide được quy định tại TCXDVN 333: 2005 nhưng không có công viên nào áp dụng loại đèn này. Các loại đèn trên còn tồn tại nhiều hạn chế về độ bền, tính năng tiết kiệm năng lượng nên dần bị các loại bóng đèn ưu việt hơn thay thế nên hiện trạng tại 5 công viên sử dụng ít hoặc không sử dụng.

3.2. Loại đèn

Loại đèn chùm chiếu đường chiếm ưu thế (53%) tiếp đến là đèn đơn 22% và đèn pha 17% đèn đường và đèn nắm chỉ chiếm 5% và 2% (Hình 3 và Bảng 1). Các loại đèn trên chiếu sáng vì mục

Bảng 1. Bảng tổng hợp thông tin hệ thống chiếu sáng 5 công viên dã khảo sát

Loại bóng đèn	CV Lê Văn Tám		CV Lê Thị Riêng		CV Tao Đàn		CV Gia Định		CV 23/9		Tổng	
	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)
Metalt Halide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HQ Compact	173	67	86	75	263	71	0	0	0	0	522	35
Ca Natri	11	4	0	0	7	2	1	62	18	86	6	6
Ca Thủy ngân	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Halogen	0	0	0	0	0	0	12	47	0	0	47	3
Led	76	29	28	25	99	27	87	280	82	826	56	56
Tổng	260	100	114	100	369	100	396	100	342	100	1481	100
Loại đèn	CV Lê Văn Tám		CV Lê Thị Riêng		CV Tao Đàn		CV Gia Định		CV 23/9		Tổng	
	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)
Đèn pha	76	29	25	22	98	27	47	12	12	4	258	17
Đèn đơn	13	5	73	64	28	8	214	54	0	0	328	22
Đèn chùm	160	62	16	14	236	64	93	23	280	82	785	53
Đèn đường	11	4	0	0	7	2	6	2	50	15	74	5
Đèn nắm	0	0	0	0	0	0	36	9	0	0	36	2
Đèn chiếu điểm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Đèn pha chiếu nước	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tổng	260	100	114	100	369	100	396	100	342	100	1481	100
Vị trí	Metal Halide (W)				Loại đèn & công suất (W)				Led (W)			
	HQ Compact (W)				Halogen (W)							
Cổng chính	0	0	0	0	70	0	0	0	0	0	40 - 200	
Cổng phụ	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	40 - 200	
Trục chính	0	0	12 - 30	0	0	0	0	0	0	0	20 - 40	
Đường nhánh	0	0	12 - 25	70	70	0	0	0	0	0	20 - 40	
Hoạt động ngoài trời	0	0	12 - 25	70	70	0	0	150	20 - 40	40		
Thảm cỏ, bồn nước	0	0	25	0	0	0	0	0				
Gam màu ánh sáng	CV Lê Văn Tám		CV Lê Thị Riêng		CV Tao Đàn		CV Gia Định		CV 23/9		Tổng	
	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)	SL	TL (%)
Ánh sáng trắng lạnh	234	90	98	86	362	98	315	80	96	28	1105	75
Ánh sáng trắng ấm	26	10	16	14	7	2	81	20	246	72	376	25
Tổng	260	100	114	100	369	100	396	100	342	100	1481	100

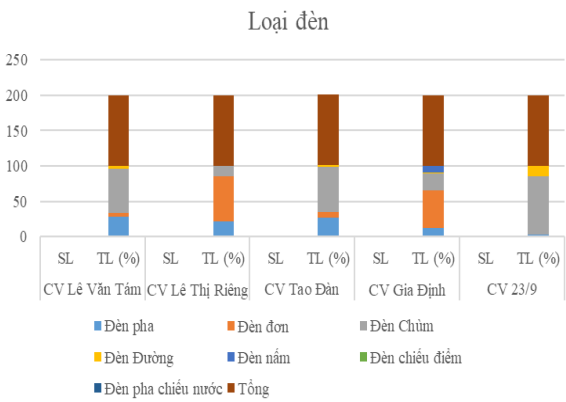
CV: Công viên, SL: Số lượng, TL: Tỷ lệ.

Bảng 1. Bảng tổng hợp thông tin hệ thống chiếu sáng 5 công viên dã khảo sát (tiếp theo)

Kiểu chiếu sáng	CV Lê Văn Tám				CV Lê Thị Riêng				CV Tao Đàn				CV Gia Định				CV 23/9				Tổng	
	SL	TL (%)	Tám	CV Lê Thị Riêng	SL	TL (%)	Riêng	Etb (Lx)	SL	TL (%)	Đàn	Etb (Lx)	SL	TL (%)	Định	Etb (Lx)	SL	TL (%)	Đàn	Etb (Lx)	SL	TL (%)
Chiếu trực tiếp	173	67	90	78	272	74	336	85	280	82	1151	78										
Chiếu lên	0	0	8	7	0	0	0	0	0	0	8	1										
Chiếu xuống	87	33	11	10	97	26	60	15	62	18	317	21										
Chiếu hội tụ	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	4	0										
Chiếu rọi bóng	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0										
Chiếu dọc	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0										
Tổng	260	100	114	100	369	100	396	100	342	100	1481	100										
Vị trí	Etb (Lx)				Etb (Lx)				Etb (Lx)				Etb (Lx)				Etb (Lx) theo TCXDVN 333: 2005					
	CV Lê Văn Tám				CV Lê Thị Riêng				CV Tao Đàn				CV Gia Định				CV 23/9					
	1,02				9,29				0,16				0,38				0					
	1,03				0				0,1				0				0,72					
	1,84				1,75				0,67				0,12				1,03					
	0,52				1,84				0,24				0,24				2,96					
	0,51				0,23				1,48				2,53				1,12					
Thảm cỏ, bồn nước	0,96				0,31				0				0				0					
Hiệu ứng chiếu sáng	CV Lê Văn Tám				CV Lê Thị Riêng				CV Tao Đàn				CV Gia Định				CV 23/9				Tổng	
	SL	TL (%)	Tám	CV Lê Thị Riêng	SL	TL (%)	Riêng	Etb (Lx)	SL	TL (%)	Đàn	Etb (Lx)	SL	TL (%)	Định	Etb (Lx)	SL	TL (%)	Đàn	Etb (Lx)		
	260	100	104	100	369	100	360	91	342	100	1435	97										
	Không có hiệu ứng chiếu sáng				0				0				0				0				4	
	Chiếu sáng định hướng				0				0				0				0				5	
	Chiếu sáng 360°				0				0				0				0				0	
	Hiệu ứng ánh trắng				0				0				0				0				0	
	Hiệu ứng tạo bóng ánh sáng				0				0				0				0				0	
	Ánh sáng hội tụ điểm nhấn				0				1				0				0				1	
	Chiếu sáng lan rộng				0				0				0				0				0	
	Hiệu ứng ánh sáng đường dẫn				0				0				36				9				36	
Ánh sáng bậc thang và sàn	0				0				0				0				0				0	
Ánh sáng tường	0				0				0				0				0				0	
Tổng	260	100	114	100	369	100	396	100	342	100	1481	100										

CV: Công viên, SL: Số lượng, TL: Tỷ lệ.

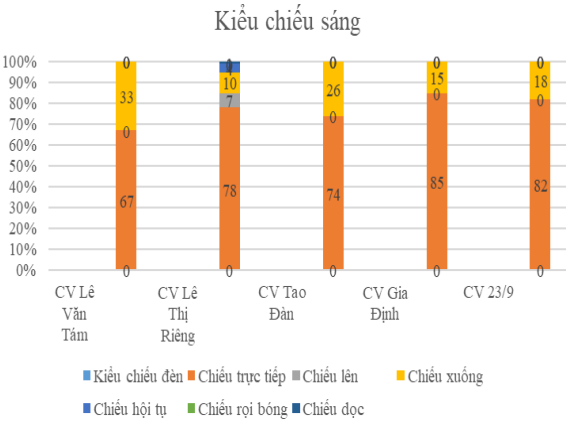
đích an toàn được quy định tại TCXDVN 333: 2005 áp dụng cho chiếu sáng công viên; đèn pha chiếu điểm và đèn pha chiếu nước chiếu sáng hỗ trợ và tôn lên cảnh sắc về đêm của công trình, đèn này mặc dù được quy định tại TCXDVN 333: 2005 nhưng không thấy xuất hiện.



Hình 3. Biểu đồ tỷ lệ loại đèn.

3.3. Kiểu chiếu sáng

Cả 5 công viên đều áp dụng kiểu chiếu sáng trực tiếp phổ biến (chiếm 78%) cụ thể là: công viên Lê Văn Tám chiếm 67%, công viên Lê Thị Riêng chiếm 78%, công viên Tao Đàn chiếm 74%, công viên Gia Định chiếm 85% và công viên 23/9 chiếm 82% (Hình 4 và Bảng 1); đây là kiểu chiếu sáng cung cấp ánh sáng nhìn rõ sự vật, đảm bảo tính an toàn cho công viên, không có yếu tố chiếu sáng nghệ thuật làm tăng tính thẩm mỹ của công trình.



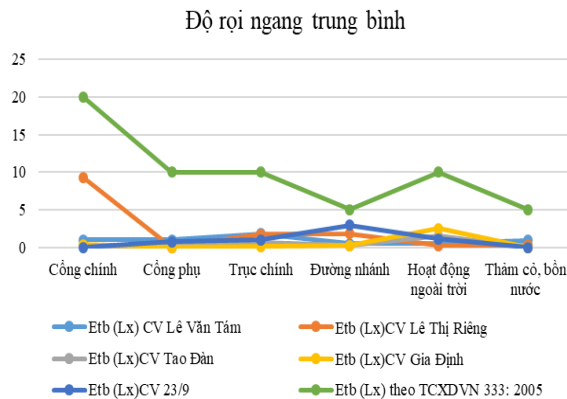
Hình 4. Biểu đồ tỷ lệ các kiểu chiếu sáng.

Bảng 1. Bảng tổng hợp thông tin hệ thống chiếu sáng 5 công viên đã khảo sát (tiếp theo)

Loại bóng đèn	CV Lê Văn Tám			CV Lê Thị Riêng			CV Tao Đàn			CV Gia Định			CV 23/9		
	Hiện trạng	Cần đạt	Hiện trạng	Cần đạt	Hiện trạng	Cần đạt	Hiện trạng	Cần đạt	Hiện trạng	Cần đạt	Hiện trạng	Cần đạt	Hiện trạng	Cần đạt	Hiện trạng
Metal Halide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HQ Compact	173	800	86	367	263	1713	0	405	0	452	0	452	0	452	0
Ca Natri	11	140	0	0	7	105	0	57	0	62	0	62	0	62	0
Ca Thủy ngân	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Halogen	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Led	76	128	28	407	99	637	343	1506	280	1430	280	1430	280	1430	280
Tổng	260	1068	114	774	369	2455	396	1968	342	1944	342	1944	342	1944	342

3.4. Độ rọi ngang trung bình

Theo Hình 5, độ rọi ngang trung bình của 5 công viên khảo sát tại các khu vực thấp hơn rất nhiều so với quy chuẩn TCXDVN 333: 2005: Cổng chính đạt 20 Lux, cổng phụ đạt 10 Lux, trục chính đạt 10 Lux, đường nhánh đạt 5 Lux, khu hoạt động ngoài trời đạt 10 Lux. Tất cả các khu vực của các công viên đều có độ rọi ngang trung bình thấp có thể do số lượng đèn không đủ hoặc công suất đèn không đạt theo tiêu chuẩn.



Hình 5. Biểu đồ độ rọi ngang trung bình các khu vực của năm công viên.

3.5. Số lượng đèn cần bổ sung và thay thế cho năm công viên

Công viên Lê Văn Tám (diện tích 6 ha) cần 1.068 bóng, hiện trạng có 260 bóng, công viên cần bổ sung 808 bóng: Cổng chính cần 9 bóng LED; cổng phụ cần 8 bóng LED 70W; trục chính cần 25 bóng LED công suất 70 W, 143 bóng HQ Compact 25 W; đường nhánh cần 53 bóng LED 70 W, 300 bóng HQ Compact 25 W và 86 bóng Ca Natri 70 W; khu hoạt động ngoài trời cần 190 bóng HQ Compact 25 W, 33 bóng LED 70 W và 54 bóng Ca Natri 70 W; thảm cỏ và bồn nước cần 167 bóng HQ Compact 25 W.

Công viên Lê Thị Riêng (diện tích 6,4 ha) cần 774 bóng, hiện trạng có 114 bóng, thiếu 660 đèn: Cổng chính cần 5 bóng LED 200 W; trục chính cần 8 bóng LED 200 W và 87 bóng HQ Compact 30 W; đường nhánh cần 244 bóng HQ Compact 30 W; khu hoạt động ngoài trời cần 36 bóng HQ Compact 30 W; thảm cỏ và bồn hoa diện tích cần 394 bóng LED 10W.

Tổng số lượng bóng cần dùng cho công viên Tao Đàn (diện tích 9 ha) để đảm bảo độ rọi ngang

trung bình là 2.455 bóng, hiện trạng có 369 bóng, cần bổ sung 2.086 bóng: Cổng chính cần 12 bóng LED 200 W; cổng phụ cần 8 bóng Led 70 W; trục chính cần 5 bóng LED 70 W, 48 bóng HQ Compact 15 W; đường nhánh cần 608 bóng LED 70 W, 615 bóng HQ Compact 15 W và 99 bóng Ca Natri 70 W; khu hoạt động ngoài trời cần 40 bóng HQ Compact 15 W, 4 bóng LED 70 W và 06 bóng Ca Natri 70 W; thảm cỏ và bồn hoa cần 1.010 bóng HQ Compact 15 W.

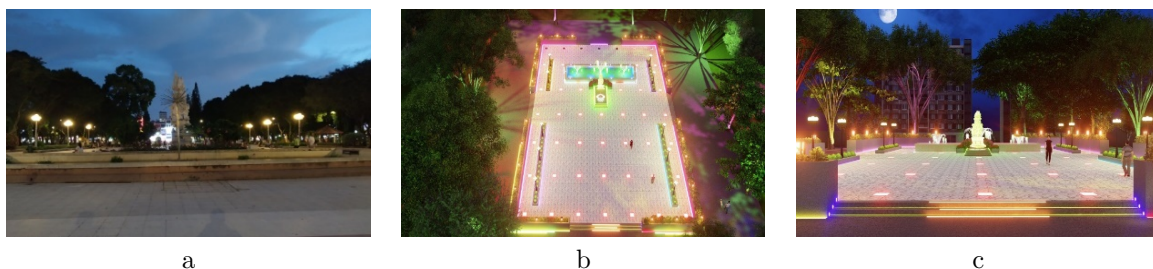
Tổng số lượng bóng cần dùng cho công viên Gia Định (5,8 ha) là 1.968 bóng, cần bổ sung 1.572 bóng: Cổng chính cần 19 bóng CA Natri 70 W; trục chính cần 477 bóng LED 20 W; đường nhánh cần 1.029 bóng LED 20 W; khu vực hoạt động tập thể cần 38 bóng CA Natri 70 W; khu thảm cỏ cần lắp đặt 405 bóng HQ Compact 23 W.

Tổng số lượng bóng cần dùng cho công viên 23/9 (9 ha) là 1.944 bóng, hiện trạng có 342 bóng, cần bổ sung 1.602 bóng: Cổng phụ cần 8 bóng CA Natri 70 W; trục chính cần 201 bóng LED 20 W; đường nhánh cần 300 bóng LED 20 W và 13 bóng CA Natri 70 W; khu hoạt động ngoài trời cần 41 bóng đèn CA Natri 70 W và 929 bóng LED 20 W; khu thảm cỏ cần 452 bóng đèn HQ Compact 23 W.

Như vậy, cả 5 công viên đều áp dụng kiểu chiếu sáng trực tiếp nhằm cung cấp ánh sáng toàn cảnh, đảm bảo an toàn, nhìn rõ cảnh vật về đêm. Kiểu chiếu sáng này gây nhầm lẫn vì không có sự thay đổi hiệu ứng, không tạo điểm nhấn về ánh sáng cho công viên. Do không sử dụng hiệu ứng chiếu sáng vì vậy cảnh quan công viên không được hỗ trợ thẩm mỹ tạo diện mạo hấp dẫn về đêm. Vì vậy, việc thiết kế chiếu sáng nghệ thuật cho các công viên trên là cần thiết, đặc biệt là khu vực trung tâm và điểm nhấn của công viên.

3.6. Thiết kế chiếu sáng nghệ thuật cho năm công viên

Các công viên đã khảo sát đóng vai trò rất quan trọng và không thể thiếu trong đời sống của cư dân đô thị, là nơi diễn ra các sinh hoạt cộng đồng, giải trí của người dân để đáp ứng cho nhu cầu giao tiếp xã hội, là nơi để tập thể dục thể thao và thư giãn nhằm tái tạo sức lao động của cư dân đô thị. Công viên còn góp phần tạo dựng không gian kiến trúc cảnh quan đặc trưng của đô thị cũng như cải thiện môi trường sống. Việc thiết kế chiếu sáng cho công viên góp phần tạo



Hình 6. Chiếu sáng công viên Lê Văn Tám. a. Hiện trạng khu quảng trường; b. Thiết kế ánh sáng khu quảng trường; c. Phối cảnh khu trung tâm.

nên không gian sôi động, náo nhiệt của một đô thị sống động (Nguyen, 2019). Với mục tiêu tạo nên những địa điểm hấp dẫn đáp ứng nhu cầu giải trí cho người dân thành phố, các thiết kế đã sử dụng ánh sáng như là công cụ để khám phá những điều kỳ diệu của nhận thức thị giác (Giordano & Ong, 2017; Boyce, 2019). Công viên được thiết kế chiếu sáng với ba loại ánh sáng (Kelly, 1952): Ánh sáng tiêu cự áp dụng cho các khu vực trung tâm của công viên nhằm đánh dấu và thu hút sự chú ý của người tham quan đến khu vực này như: Quảng trường, trục chính công viên...; Ánh sáng phát quang xung quanh áp dụng cho môi trường cây xanh xung quanh để tạo ánh sáng nền cho toàn bộ không gian chiếu sáng; Ánh sáng rực rỡ tạo điểm nhấn như quảng trường, tượng đài, các công trình kiến trúc nổi bật với sự thay đổi và đầy màu sắc nhằm kích thích các dây thần kinh thị giác, đánh thức sự tò mò và tạo sự lôi kéo cuốn hút người xem (Nguyen, 2019).

Loại đèn sử dụng trong thiết kế đều là đèn LED, đây là loại đèn có khả năng kiểm soát độ sáng và màu sắc ánh sáng, công nghệ và tính chất định hướng của đèn LED tốt, có ít ánh sáng lãng phí do đó tiết kiệm năng lượng hơn các loại đèn khác (Nguyen, 2019). Gam màu ánh sáng sử dụng trong các thiết kế chủ yếu là gam màu lạnh phù hợp với các khu công cộng có không gian rộng, khu vực có nhiều cây xanh, gam màu lạnh như xanh lục, xanh da trời, ... tạo cảm giác tươi mát, làm dịu sự kích động, tạo cảm giác bình yên, thư giãn (Nguyen, 2020). Các điểm nhấn của thiết kế sử dụng gam màu rực rỡ nhiều màu sắc nhằm làm nổi bật và thu hút người xem.

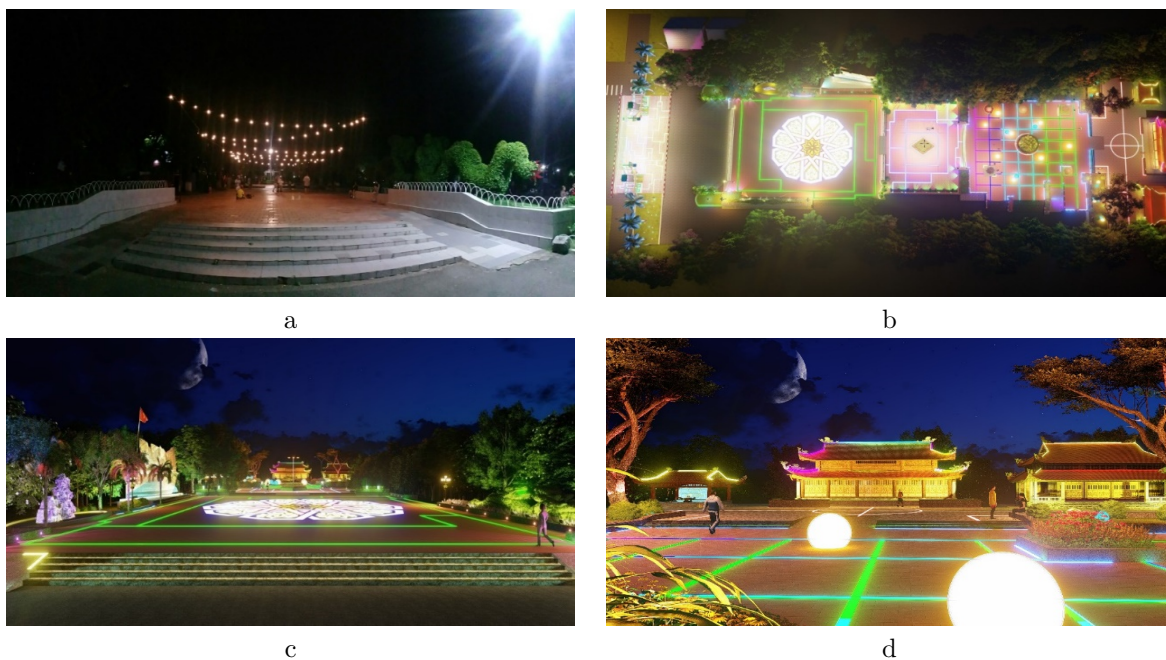
3.6.1. Công viên Lê Văn Tám

Khu vực quảng trường, nơi đặt tượng đài Lê Văn Tám được chọn để chiếu sáng nghệ thuật

(Hình 6). Ý tưởng thiết kế là hình ảnh người thiếu niên với ngọn đuốc tượng trưng cho lòng yêu nước và tinh thần cách mạng. Chân tượng đài là họa tiết ngọn đuốc bằng đèn Led, sau tượng đài là bồn nước với những vòi nước chảy liên tục kết hợp đèn âm, mỗi vòi phun sử dụng 05 đèn âm nước chiếu lên kết hợp với tia nước tạo điểm nhấn cho khu vực này. Sử dụng đèn LED dây công suất 6 W và LED âm sàn công suất 10 W với nhiều pha màu rực rỡ, thay đổi liên tục để tạo hiệu ứng, đánh thức thị giác và thu hút người xem (Kelly, 1952; Nguyen, 2019). Đèn Led âm sàn (10 W) tại quảng trường, cung cấp ánh sáng tiêu cự làm nổi bật quảng trường trung tâm công viên. Các bồn hoa và cây xanh xung quanh dùng đèn hắt công suất 20-40 W với các gam màu lạnh nhằm cung cấp nền ánh sáng phát quang khu vực cây xanh xung quanh quảng trường (Kelly, 1952; Nguyen, 2019).

3.6.2. Công viên Lê Thị Riêng

Trục nối từ cổng chính đến nhà truyền thống (nơi đặt mộ bà Lê Thị Riêng và bia tưởng niệm Trần Phú) là điểm thu hút và nền tảng lịch sử của công viên văn hóa Lê Thị Riêng. Ý tưởng thiết kế là hình ảnh người nữ anh hùng kiên trung. Thiết kế chia làm 3 khu: cổng chính, trục chính và nhà truyền thống (Hình 7). Cổng chính được thiết kế với những đường thẳng nhiều màu sắc rực rỡ (đèn LED công suất 24W) tạo điểm nhấn (Kelly, 1952; Nguyen, 2019) và tái hiện cuộc đời bà đã chiến đấu với thực dân Pháp. Trục chính là hình ảnh hoa sen thể hiện sự biết ơn người đã hy sinh gia đình để đấu tranh giải phóng dân tộc, họa tiết hình tròn thể sự ôm ấp của người mẹ dành cho con. Các bồn hoa và cây xanh xung quanh trục thiết kế sử dụng đèn hắt (50 W) với gam màu lạnh nhằm tạo nền ánh sáng làm nổi bật cảnh quan khu trung tâm về đêm. Kiểu và hiệu ứng



Hình 7. Chiếu sáng công viên Lê Thị Riêng. a. Hiện trạng trực chính; b. Thiết kế chiếu sáng trực chính; c. Góc nhìn từ cổng chính và d. Phối cảnh nhà truyền thống.



Hình 8. Chiếu sáng công viên Tao Đàn a. Hiện trạng khu vực tháp Chăm; b. Ánh sáng định hướng lối đi và điệu múa của người Chăm; c. Ánh sáng nghệ thuật khu vực tháp Chăm.



a



b

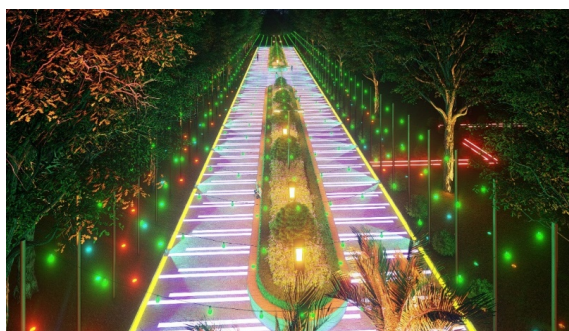


c

Hình 9. Chiếu sáng công viên Gia Định. a. Hiện trạng khu trung tâm; b. Biểu tượng trái đất của thiết kế; c. Phối cảnh ánh sáng nghệ thuật khu trung tâm.



a



b

Hình 10. Chiếu sáng công viên 23/9. a. Hiện trạng trực chính công viên 23/9; b. Phối cảnh chiếu sáng nghệ thuật tại trực chính.

chiếu sáng: chiếu hội tụ để tôn vinh tượng đài Trần Phú, chiếu sáng tường để làm tăng vẻ đẹp của nhà truyền thống, chiếu lên nhằm hướng ánh mắt của người xem vào tượng đài, cây xanh và không gian.

3.6.3. Công viên Tao Đàn

Nguyên mẫu của Tháp Chăm ở công viên là Tháp Bà Ponagar ở Nha Trang. Ý tưởng thiết kế cho khu này là văn hóa của dân tộc Chăm

với Tháp Chăm là công trình kiến trúc làm điểm nhấn trong thiết kế ánh sáng. Thiết kế theo sự uyển chuyển trong điệu múa Chăm qua từng đường nét ánh sáng. Tại bậc bước lên của chân tháp, sử dụng họa tiết điệu múa của người Chăm, kiểu chiếu sáng định hướng để dẫn lối đến trung tâm của tháp. Những đường nét trên chóp tháp sử dụng đèn LED dây 24W với những nhiều pha màu rực rỡ, thay đổi liên tục để tạo hiệu ứng, đánh thức thị giác và thu hút người xem (Kelly, 1952; Nguyen, 2019) và nhằm tôn vinh kiến trúc của tháp (Hình 8). Thảm cỏ và cây bóng mát xung quanh sử dụng đèn hắt chiếu lên với các gam màu lạnh phù hợp với không gian công cộng nhiều cây xanh và tạo nền ánh sáng xung quanh khu vực Tháp Chăm, trung tâm của thiết kế (Nguyen, 2020).

3.6.4. Công viên Gia Định

Nghiên cứu đã chọn khu vực trung tâm, nơi giao nhau của các trục chính có đường nét mặt bằng hình tròn và các bụi cây được tạo dáng hình cầu giống Trái Đất thu nhỏ. Thiết kế sử dụng đèn Led dây 24 W và 72 W nhiều màu rực rỡ, tạo các vòng tròn đồng tâm hướng về trung tâm là biểu tượng trái đất nhằm tạo sự thu hút và đánh thức thị giác của người thưởng ngoạn (Kelly, 1952; Nguyen, 2019). Gam màu ánh sáng chủ yếu là vàng thể hiện sức mạnh của sự đoàn kết bảo vệ hành tinh xanh. Bồn hoa xung quanh dùng đèn Led bao quanh bồn và đèn hắt để hỗ trợ cảnh quan. Cây xanh được chiếu sáng bằng đèn hắt cây với gam màu lạnh tạo nền ánh sáng xung quanh làm nổi bật khu trung tâm. Bậc tam cấp dẫn lối lên khu trung tâm dùng đèn Led 24 W dây nhằm chiếu sáng an toàn và định hướng lối đi (Hình 9).

3.6.5. Công viên 23/9

Công viên là ga xe lửa Sài Gòn do Pháp xây dựng trước năm 1975, do địa thế và lịch sử nên công viên có rất nhiều khách tham quan là người nước ngoài và thường đông đúc khi đêm về. Trục chính được chọn thiết kế chiếu sáng nghệ thuật nhằm cung cấp ánh sáng thu hút và tạo không gian thẩm mỹ cho công viên. Ý tưởng thiết kế dựa trên đường ray xe lửa kết hợp cùng với các đèn Led dây 24 W âm sàn mô phỏng các phím đàn thể hiện sự năng động, phù hợp với cái tên thành phố không ngủ mà những du khách từng biết đến (Hình 10). Trên cao treo đèn bóng Led 2

W như những chùm hoa đăng. Cây xanh và thảm cỏ xung quanh dùng đèn hắt cây 50 W gam màu lạnh, hiệu ứng chiếu lên để thu hút ánh nhìn của người tham quan và tạo ánh sáng nền (Nguyen, 2020) làm nổi bật trục trung tâm của công viên.

4. Kết Luận và Kiến Nghị

Nghiên cứu đã điều tra được hiện trạng hệ thống chiếu sáng của 5 công viên tại Tp. Hồ Chí Minh và đánh giá mức độ phù hợp của hiện trạng với 2 quy chuẩn của Bộ Xây Dựng về các chỉ tiêu: loại bóng đèn, loại đèn, kiểu chiếu sáng và độ rọi ngang trung bình từ đó tính toán sơ bộ số lượng đèn cần có cho công viên theo quy định; đề tài cũng thiết kế ánh sáng nghệ thuật cho khu vực trung tâm của mỗi công viên lấy ý tưởng từ lịch sử hình thành và phát triển của công viên. Đề tài chỉ dừng lại ở việc đề xuất thiết kế mà chưa tiến hành thi công và lắp đặt để theo dõi hiệu quả các bản vẽ thiết kế này.

Lời Cam Đoan

Bài báo được sự đồng thuận của tất cả tác giả đứng tên.

Lời Cảm Ơn

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí bởi Trường Đại học Nông Lâm Thành phố Hồ Chí Minh.

Tài Liệu Tham Khảo (References)

- Beccali, M., Bonomolo, M., Galatioto, A., & Pulvirenti, E. (2017). Smart lighting in a historic context: a case study. *Management of Environmental Quality: An International Journal* 28(2), 282–298.
- Birren, F. (1978). *Colour and human response: aspects of light and color bearing on the reactions of living things and the welfare of human beings*. New York, USA: Van Nostrand Reinhold
- Boyce, P. R. (2019). The benefits of light at night. *Building and Environment* 151, 356–367.
- Cai, J. X., Zhu, Z. J., Chen, J., & Fan, M. R. (2013). The design of new technology system in the intelligent Building's lighting. *Applied Mechanics and Materials* 353-356, 3141-3144.
- Cucchiella, F., Berardinis, P. D., Lenny, Koh S. C., & Rotilio, M. (2017). Planning restoration of a historical landscape: A case study for integrating a sustainable street lighting system with observation of historical values. *Journal of Cleaner Production* 165, 579-588.

- Edensor, T. (2015). Light design and atmosphere. *Visaul Communication* 14(3), 331-350.
- Edensor, T. (2012). Illuminated atmospheres: anticipating and reproducing the flow of affective experience in Blackpool. *Environment and Planning D: Society and Space* 30, 1103-1122.
- ECFS (European Committee for Standardization, EN 13201-1). (2015). *Dynamic light: Handbook about interpretation of EN 13201*. Retrieved October 10, 2017, from <https://www.interreg-central.eu/Content.Node/Dynamic-Light/04-DL-Handbook-about-interpretation-of-EN-13201.pdf>.
- ENIU (Ente Nazionale Italiano di Unificazione, UNI 11248). (2016). *Road Lighting - Selection of lighting classes, Milano*. Retrieved February 13, 2017, from https://kupdf.net/download/uni-11248-en-13201-tables_58a167846454a73b3db1e8e7_pdf.
- Giordano, E., & Ong, C. E. (2017). Light festivals, policy mobilities and urban tourism. *Tourism Geographies* 19(5), 699-716.
- ICOI (International Commission on Illumination). (2010). *Lighting of roads for motor and Pedestrian traffic (CIE 115)*. Vienna, Austria: CIE Central Bureau.
- Jankowski, W. (1993). *Lighting exteriors and landscape*. New York, USA: PBC.
- Mansfield, K. P. (2018). Architectural lighting design: A research review over 50 years. *Lighting Research & Technology* 50(1), 80-97.
- Masbouni, A. (2003). *Penser la ville par la lumière*. Paris, France: Éditeur La Villette.
- MOC (Ministry of Construction) (2016). Circular No. 01/2016/TT-BXD dated February 1, 2016 on "National standards for technical infrastructure construction, lighting construction". Retrieved February 10, 2016, from <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/Xay-dung-Do-thi/Thong-tu-01-2016-TT-BXD-quy-chuan-ky-thuat-quoc-gia-cac-cong-trinh-ha-tang-ky-thuat-304552.aspx>.
- Moyer, J. L. (2005). *The Landscape Lighting Book*. New York, USA: John Wiley and Sons.
- Narbone, R. (1995). *La lumière urbaine: éclairer les espaces publics [Urban light, lighting public areas]*. Le Moniteur, Paris: Éditeur Le Moniteur.
- Nguyen, H. T. (2020). *Some concepts, standards and architectural lighting solutions*. Retrieved March 23, 2021, from <http://hapulico.com/mot-so-khai-niem-tieu-chuan-va-cac-giai-phap-chieu-sang-kien-truc.html>.
- Nguyen, H. T. T. (2019). Some views and principles on artistic lighting on the exterior of high-rise buildings in urban areas. *Architecture Magazine* 8, 64-68.
- Seshadri, K. (1997). City beautification at night. *Journal of the Illuminating Engineering Institute of Japan* 81, 139-140.
- SOLAF (Society of Light and Lighting). (2016). *Lighting guide 6: The exterior environment*. London, UK: CIBSE.
- Tural, M., & Yener, C. (2016). Lighting monuments: Reflections on outdoor lighting and environment appraisal. *Building and Environment* 41(6), 775-782.
- Valetti, L., Pellegrino, A., & Aghemo, C. (2019). Cultural landscape: Towards the design of a nocturnal lightscape. *Journal of Cultural Heritage* 42(2), 181-190.