

SỬ DỤNG DỊCH CHIẾT BẠCH HOA XÀ (*Plumbago zeylanica* L.) TRONG ƯƠNG ẤU TRÙNG TÔM CÀNG XANH (*Macrobrachium rosenbergii*)

• Nguyễn Lê Hoàng Yến^(*), Lâm Sơn Minh^(*)

Tóm tắt

Nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá sự ảnh hưởng của phương pháp tách chiết và liều lượng dịch chiết Bạch hoa xà (*Plumbago zeylanica* L.) được bổ sung trong nước nuôi lên sự phát triển của ấu trùng tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*). Bạch hoa xà được chiết xuất bằng 2 phương pháp: (i) đun lá Bạch hoa xà với nước cất và (ii) ngâm lá Bạch hoa xà trong cồn 70%. Liều lượng dịch chiết Bạch hoa xà bổ sung trong nước ương nuôi ấu trùng tôm càng xanh: 0 (đối chứng), 200, 300 và 400 g/m³. Kết quả thí nghiệm cho thấy, bổ sung dịch chiết Bạch hoa xà trong nước ương đã tăng tỷ lệ sống của ấu trùng khi chuyển sang giai đoạn hậu ấu trùng và giảm nguy cơ nhiễm một số nhóm ngoại ký sinh, góp phần tăng năng suất trong ương ấu trùng tôm càng xanh.

Từ khóa: Bạch hoa xà (*Plumbago zeylanica* L.), tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*), ương ấu trùng, ngoại ký sinh.

1. Giới thiệu

Theo quy hoạch của Hội Nghề cá Việt Nam tại Đồng bằng sông Cửu Long (ĐBSCL) đến năm 2015, diện tích nuôi tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*) là 26.900 ha và đến năm 2020 là 35.100 ha [6]. Tuy nhiên vấn đề con giống là khó khăn lớn nhất, nguồn giống tôm càng xanh hiện nay chưa đáp ứng được tiềm năng phát triển của vùng cả về số lượng lẫn chất lượng. Các trại sản xuất giống tôm càng xanh tại ĐBSCL thường có năng suất không ổn định, trở ngại này do nhiều nguyên nhân, trong đó có nguyên nhân do ảnh hưởng của nhóm protozoa phát triển trong nước ương và nhóm ngoại ký sinh bám trên tôm, chúng thường làm cản trở quá trình lột xác của ấu trùng và đã trở thành một rào cản trong khâu sản xuất giống. Song, việc sử dụng các loại hóa chất để xử lý các nhóm ngoại ký sinh trong quá trình ương ấu trùng tôm càng xanh đôi lúc mang lại hiệu quả không như mong muốn. Thời gian gần đây, nhiều nghiên cứu ứng dụng thảo dược, chế phẩm sinh học đã được thực hiện và bước đầu mang lại kết quả khả quan trong nuôi thủy sản; trong đó có cây Bạch hoa xà (*Plumbago zeylanica* L., 1753) là loại thảo dược mới, với thành phần hóa học chính là chất plumbagin - C₁₁H₈O₃ (2-methyl-5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone), có khả năng kháng khuẩn, tiêu diệt một số nhóm ngoại ký sinh trùng (KST) [3], một trong những nguyên nhân gây thất bại trong

sản xuất giống. Từ tình hình thực tế về vấn đề con giống tôm càng xanh và trên cơ sở những nghiên cứu ứng dụng thảo dược trong thủy sản, nghiên cứu “Sử dụng dịch chiết Bạch hoa xà (*Plumbago zeylanica* L.) trong ương ấu trùng tôm càng xanh (*Macrobrachium rosenbergii*)” được thực hiện nhằm cung cấp bước đầu những thông tin về khả năng ứng dụng Bạch hoa xà trong sản xuất giống tôm càng xanh.

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Chuẩn bị

Ấu trùng tôm càng xanh: tôm mẹ ôm trứng được mua từ các vựa thu mua tôm đánh bắt tự nhiên. Những cá thể khỏe mạnh, không thương tích, trứng có màu nâu sậm đồng đều được chọn và xử lý bằng Formol 20 ppm trong 30 phút trước khi cho vào bể chờ trứng nở (S‰ = 5‰). Ấu trùng sau khi nở được thu và xử lý qua Formol 200 ppm trong 30 giây, định lượng và bố trí vào bể ương.

Phương pháp chiết xuất Bạch hoa xà

Phương pháp 1 (phương pháp gia nhiệt): đun lá Bạch hoa xà đã được nghiền mịn với nước cất ở nhiệt độ 100°C và hãm trong điều kiện này 15 phút. Tỷ lệ lá : nước là 1 : 1. Vắt lấy dịch chiết và thêm nước cất vào cho đủ thể tích ban đầu, bảo quản ở 4 - 6°C [2].

Phương pháp 2 (phương pháp chiết xuất bằng cồn 70%): lá Bạch hoa xà được nghiền mịn cho vào bình thủy tinh, thêm cồn 70% vào với tỷ lệ cồn : lá là 1 : 1, bịt kín miệng bình để ở nhiệt độ phòng trong 8 giờ, sau đó hỗn hợp dịch được đũa hết cồn bằng phương pháp gia nhiệt ở 40°C. Nước cất được

^(*) Trường Đại học Tây Đô.

thêm vào cho đủ thể tích ban đầu và vắt dịch chiết. Dịch chiết được trữ lạnh ở nhiệt độ 4 - 6°C để tiện sử dụng trong nhiều ngày [1].



Hình 1. Hình ảnh lá Bạch hoa xà
(Nguồn: hocvienquany.vn)

2.2. Bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm gồm 7 nghiệm thức: 01 nghiệm thức đối chứng (ĐC) và 06 nghiệm thức với 2 phương pháp chiết xuất Bạch hoa xà và 3 khối lượng Bạch hoa xà sử dụng lần lượt là 200 g/m³; 300 g/m³; 400 g/m³. Mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, các lô thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên trên hệ thống 21 thùng nhựa có thể tích 60 lít/thùng.

Bảng 1. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Nghiệm thức	Nhân tố 1 (phương pháp chiết xuất)	Nhân tố 2 (gram lá Bạch hoa xà/m ³ nước ương)
ĐC	-	0
N200	Phương pháp gia nhiệt	200
N300		300
N400		400
C200	Phương pháp chiết xuất bằng cồn 70%	200
C300		300
C400		400

2.3. Chăm sóc, quản lí và phân tích mẫu trong thí nghiệm

Ấu trùng được cho ăn từ ngày thứ 2 sau khi nở bằng *Artemia* bung dù 2 lần/ngày (6h và 16h). Khi ấu trùng đạt giai đoạn IV tiến hành bổ sung thức ăn chế biến được chế biến theo công thức thức ăn của Nguyễn Thanh Phương và cộng sự (2003) [4],

kích cỡ hạt thức ăn dành cho ấu trùng tôm càng xanh dao động từ 300 - 700 μm tùy thuộc vào giai đoạn phát triển của ấu trùng.

Trong quá trình thí nghiệm, nhiệt độ và pH được xác định 2 lần/ngày (7 giờ và 14 giờ); Các chỉ tiêu TAN, N-NO₂⁻, N-NO₃⁻ được thu mẫu định kỳ 5 ngày/lần và phân tích theo phương pháp lần lượt là Indophenol blue, Griess Ilosvay, Salycilate.

KST được quan sát bằng cách kiểm tra ngẫu nhiên 30 ấu trùng/nghiệm thức bằng kính hiển vi 5 ngày/lần. KST được quan sát và định danh theo Bùi Quang Tề (2006) [5]. Tỷ lệ nhiễm KST trên ấu trùng được xác định theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ ấu trùng nhiễm KST (\%)} = \frac{\text{Tổng số ấu trùng bị nhiễm KST}}{\text{Tổng số ấu trùng quan sát}} \times 100$$

2.4. Tỷ lệ sống của ấu trùng

Khi ấu trùng chuyển sang Postlarvae (PL) trên 80%, tiến hành hạ dần độ mặn (không quá 4‰/ngày), khi độ mặn đạt 0‰ tiến hành đếm số lượng PL và ấu trùng còn lại/bể và xác định tỷ lệ sống theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{Số lượng PL thu được} + \text{số ấu trùng}}{\text{Tổng số ấu trùng ban đầu}} \times 100$$

2.5. Phương pháp xử lí số liệu

Số liệu được tính toán bằng phần mềm Microsoft Office (Excel) và xử lý thống kê bằng phần mềm xử lí SPSS 20.0.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Sự biến động các yếu tố môi trường

Nhiệt độ và pH

Bảng 2. Sự biến động nhiệt độ và pH trong thời gian thí nghiệm

Nghiệm thức	Nhiệt độ (°C)		pH	
	Sáng	Chiều	Sáng	Chiều
N200	26,5 ± 0,55	30,2 ± 0,90	8,0 ± 0,08	8,2 ± 0,17
N300	26,6 ± 0,56	30,3 ± 0,92	7,9 ± 0,05	8,1 ± 0,11
N400	26,6 ± 0,61	30,3 ± 0,95	8,0 ± 0,13	8,2 ± 0,18
C200	26,6 ± 0,60	30,2 ± 0,92	8,0 ± 0,12	8,1 ± 0,10
C300	26,6 ± 0,59	30,3 ± 0,89	8,0 ± 0,13	8,2 ± 0,17
C400	26,6 ± 0,59	30,3 ± 0,92	7,9 ± 0,05	8,1 ± 0,13
ĐC	26,6 ± 0,58	30,1 ± 0,80	8,0 ± 0,13	8,1 ± 0,14

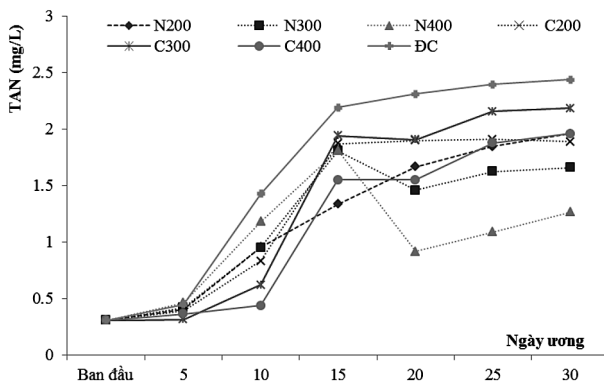
Nhiệt độ giữa các nghiệm thức biến động thấp và dao động từ 26,5 ± 0,55°C đến 26,6 ± 0,61°C vào buổi sáng và từ 30,1 ± 0,8°C đến 30,3 ± 0,95°C vào buổi chiều (Bảng 2). Nhiệt độ nước ương ở các

thực nghiệm giữa buổi sáng và chiều chênh lệch khoảng $\pm 4,0 - 4,5^\circ\text{C}$ là tương đối lớn nhưng vẫn nằm trong khoảng dao động cho phép và an toàn cho ấu trùng.

pH trung bình ở các nghiệm thức khá ổn định, dao động trong khoảng $7,9 \pm 0,05$ đến $8,0 \pm 0,13$ vào buổi sáng và từ $8,1 \pm 0,10$ đến $8,2 \pm 0,18$ vào buổi chiều. Theo Nguyễn Thanh Phương và cộng sự (2003) [4] thì khoảng pH thích hợp cho sự phát triển của ấu trùng tôm càng xanh là 7,0 - 8,5. Trong thí nghiệm có những thời điểm pH xuống mức 7,9 vào buổi sáng và tăng lên 8,5 vào buổi chiều, chênh lệch khoảng $\pm 0,6$ đơn vị và không gây ảnh hưởng cho ấu trùng tôm càng xanh.

Tổng đạm Ammonia (Total Ammonia Nitrogen - TAN)

Trong suốt quá trình thí nghiệm, hàm lượng TAN ở tất cả các nghiệm thức dao động từ 0,307 - 2,440 mg/l và có xu hướng tăng từ ngày ương thứ 10, đạt cực đại ở ngày ương thứ 15, đến ngày ương thứ 20 hàm lượng TAN lại có xu hướng giảm sau đó tăng nhẹ và duy trì đến cuối chu kỳ ương.



Hình 2. Biến động hàm lượng TAN trong thí nghiệm

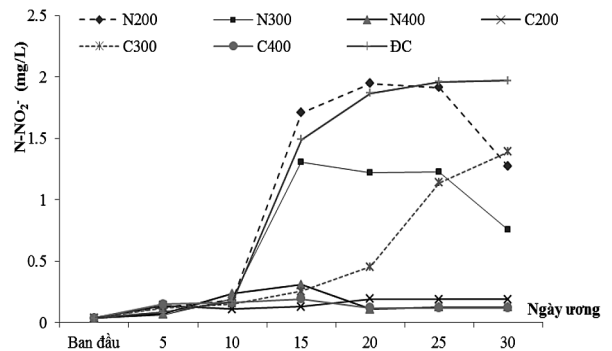
Các nghiệm thức N200, N300, N400 có hàm lượng TAN biến động trong khoảng 0,404 - 1,96 mg/l. Vào cuối chu kỳ ương, TAN ở các nghiệm thức này tỷ lệ nghịch với lượng dịch chiết Bạch hoa xà sử dụng. Bên cạnh đó, các nghiệm thức sử dụng Bạch hoa xà chiết xuất bằng cồn 70% có hàm lượng TAN nằm trong khoảng 0,313 - 2,18 mg/l, cao nhất ở nghiệm thức C300 (2,180 mg/l). So với các nghiệm thức sử dụng dịch chiết được chiết xuất bằng nước cất đun thì phương pháp chiết xuất bằng cồn tuy có hàm lượng TAN cao hơn nhưng ít

biến động hơn. Thời điểm cuối chu kỳ ương, hàm lượng TAN ở các nghiệm thức có bổ sung dịch chiết nằm trong khoảng 1,66 - 2,18 mg/l và luôn biến động thấp hơn so với nghiệm thức ĐC (2,44 mg/l). Điều này thể hiện tác dụng cải thiện môi trường của dịch chiết Bạch hoa xà trong ương ấu trùng tôm càng xanh.

Nitrite (N-NO₂⁻)

Hàm lượng N-NO₂⁻ trung bình giữa các nghiệm thức dao động trong khoảng 0,060 - 1,973 mg/l. Trong 10 ngày đầu của chu kỳ ương, hàm lượng nitrite ở tất cả các nghiệm thức ít biến động, tuy nhiên từ ngày ương thứ 10 đến cuối chu kỳ ương, hàm lượng nitrite lại có xu hướng tăng mạnh, cụ thể ở các nghiệm thức N200, N300 và ĐC. Cuối chu kỳ ương, hàm lượng nitrite ở nghiệm thức ĐC đạt cao nhất (1,97 mg/l), cao gấp khoảng 17 lần so với hàm lượng nitrite ở các nghiệm thức C200 và C400.

Hàm lượng nitrite ở các nghiệm thức N400, C200 và C400 luôn duy trì ở mức thấp (khoảng 0,1 mg/l) cho đến cuối thí nghiệm. Như vậy, việc sử dụng dịch chiết Bạch hoa xà trong nước ương ấu trùng có tác dụng tốt đến môi trường nước ương, làm giảm lượng N-NO₂⁻ trong nước.



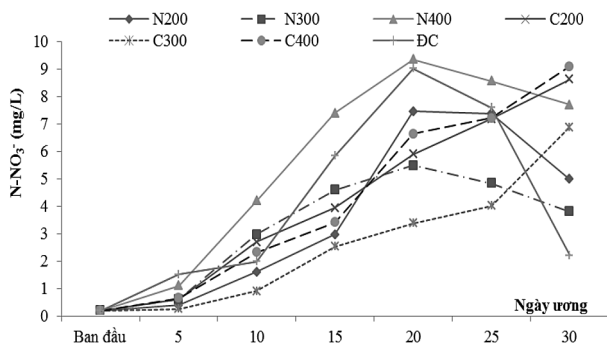
Hình 3. Biến động hàm lượng nitrite trong thí nghiệm

Nitrate (N-NO₃⁻)

Hàm lượng nitrate ở tất cả các nghiệm thức có xu hướng biến động tăng dần trong thời gian thí nghiệm và dao động trong khoảng từ 0,20- 9,09 mg/l. Tất cả các nghiệm thức có sử dụng dịch chiết Bạch hoa xà được chiết xuất bằng hai phương pháp có hàm lượng nitrate cao hơn nghiệm thức ĐC; Quá trình nitrate hóa diễn ra mạnh ở nghiệm thức

C200; C300; C400 góp phần làm gia tăng $N-NO_3^-$ ở các nghiệm thức này nhanh hơn so với các nghiệm thức khác trong thí nghiệm. Cụ thể như nghiệm thức C400 có hàm lượng nitrate cao nhất (đạt 9,09 mg/l) ở cuối chu kỳ ương và cao hơn nghiệm thức ĐC gấp 4,1 lần (đạt 2,22 mg/l).

Nhìn chung hàm lượng nitrate trong suốt quá trình thí nghiệm đều nằm trong khoảng thích hợp và thuận lợi cho sự phát triển bình thường của ấu trùng tôm càng xanh.



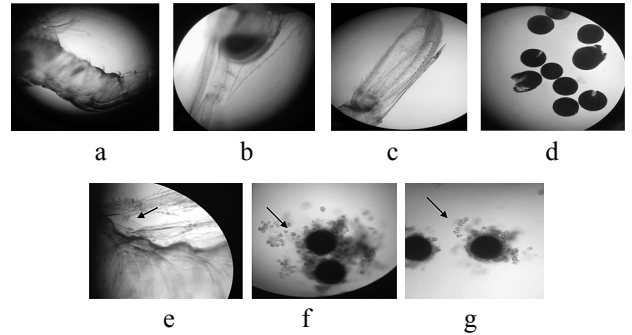
Hình 4. Biến động hàm lượng nitrate trong thí nghiệm

3.2. Tỷ lệ nhiễm KST trong quá trình ương

Trong quá trình thí nghiệm, do sử dụng thảo dược nên hoàn toàn không dùng hóa chất. KST được tìm thấy trên ấu trùng và vỏ trứng *Artemia* là nhóm trùng loa kèn, *Vorticella* và *Zoothamnium*, kết quả này phù hợp với nhận định của Bùi Quang Tề (2006) [5], các giống thường gây bệnh trên ấu trùng tôm càng xanh là *Vorticella*, *Zoothamnium*, *Epistylis* và *Apiosoma*, trong đó hai giống *Vorticella* và *Zoothamnium* là hai giống phổ biến.

Bảng 3. Tỷ lệ nhiễm KST ở các nghiệm thức

Ngày tuổi ấu trùng (ngày)	Tỷ lệ nhiễm (%)					
	ĐC		N200	N300	N400	C200
	Ấu trùng	Vỏ <i>Artemia</i>	Ấu trùng	C300	C400	Vỏ <i>Artemia</i>
Ban đầu	0,0	0,0	Không có			Không có
5	0,0	0,0	Không có			Không có
10	0,0	65,0	Không có			Không có
15	6,67	80,0	Không có			Không có
20	10,0	95,0	Không có			Không có
25	13,3	100	Không có			Không có
30	16,7	100	Không có			Không có



Hình 5. Một số hình ảnh quan sát nhóm trùng loa kèn trên ấu trùng và vỏ Artemia

(a, b, c, d: ấu trùng và vỏ Artemia ở các nghiệm thức bổ sung dịch chiết Bạch hoa xà
e, f, g: ấu trùng và vỏ Artemia ở nghiệm thức ĐC)

Các nhóm KST xuất hiện ở nghiệm thức ĐC trên cả vỏ *Artemia* và ấu trùng từ ngày thứ 10 và vỏ *Artemia* chính là nguồn lây nhiễm ký sinh cho ấu trùng tôm, kết quả phù hợp với nhận định của Nguyễn Thanh Phương và cộng sự (2003) [4]. Tuy nhiên, tất cả các nghiệm thức có sử dụng dịch chiết Bạch hoa xà (không phân biệt phương pháp chiết xuất và liều lượng của thí nghiệm) đều không bị nhiễm KST trong quá trình ương. Điều này do tác dụng của chất plumbagin - $C_{11}H_8O_3$ (2-methyl-5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) là thành phần dược liệu đặc biệt trong cây Bạch hoa xà và có tác dụng kháng khuẩn đối với các chủng: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus antracis*, *Enterobacter cloaceae*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Nesseria gonorrhoea*, *Samonella Dublin*, *mycobacterium pheli* [2] cũng như có thể tiêu diệt nhiều loài sinh vật độc hại như *Acalymma vittata*, *Achaea janata*, *Mythimma separata*, *Corcyra cephalonica*, *Dysdercus cingulatus*, *Dysdercus cingulatus*, *Pectinophora gossypiella*, *Dysdercus koenigii*, *Heliothis virescens*, *Heliothis zea* [2].

Điều này chứng tỏ, việc sử dụng dịch chiết Bạch hoa xà có tác dụng phòng ngoại ký sinh xuất hiện trong quá trình ương tôm càng xanh hiệu quả.

3.3. Tỷ lệ sống của ấu trùng tôm càng xanh

Tỷ lệ sống trung bình của ấu trùng trong thí nghiệm dao động trong khoảng 19 - 65%. Nghiệm thức C400 có tỷ lệ sống của ấu trùng cao nhất ($65 \pm 2\%$), khác biệt rất có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với ĐC ($19 \pm 2\%$) và tất cả các nghiệm thức còn lại.

Bảng 4. Tỷ lệ sống (%) của ấu trùng tôm càng xanh ở các nghiệm thức

Nghiệm thức	Tỷ lệ sống (%)
N200	25 ± 3 ^b
N300	46 ± 6 ^d
N400	43 ± 5 ^d
C200	42 ± 1 ^d
C300	31 ± 1 ^c
C400	65 ± 2 ^e
ĐC	19 ± 2 ^a

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái giống nhau thì khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$).

Nếu so sánh tỷ lệ sống của ấu trùng theo các phương pháp chiết xuất thì nghiệm thức dùng phương pháp chiết xuất Bạch hoa xà bằng cồn 70% có tỷ lệ sống trung bình cao nhất (46 ± 15%) và khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức ĐC (19 ± 2%) và nghiệm thức sử dụng phương pháp gia nhiệt trong chiết xuất Bạch hoa xà.

Ấu trùng tôm càng xanh nếu bị nhiễm nguyên sinh động vật với mật độ cao sẽ cản trở quá trình lột xác, có thể gây chết [4]. Như vậy, sử dụng dịch chiết Bạch hoa xà được chiết xuất bằng cồn 70% và với các liều lượng khác nhau đều có tác dụng tích

cực, góp phần cải thiện và ổn định môi trường nước ương, nâng cao tỷ lệ sống ấu trùng tôm càng xanh.

Bảng 5. Tỷ lệ sống của ấu trùng giai đoạn PL tính theo phương pháp chiết xuất

Phương pháp chiết xuất	Tỷ lệ sống trung bình (%)
Đun với nước cất (N)	38 ± 11 ^b
Dùng cồn 70° (C)	46 ± 15 ^c
Không dùng dịch chiết (ĐC)	19 ± 2 ^a

Ghi chú: Xem Bảng 4.

4. Kết luận

Ấu trùng tôm càng xanh và vỏ *Artemia* ở tất cả các nghiệm thức có sử dụng dịch chiết Bạch hoa xà đều không bị nhiễm nhóm trùng loa kèn, *Vorticella* và *Zoothamnium*.

Sử dụng dịch chiết Bạch hoa xà được chiết xuất bằng cồn 70% với liều lượng 400 g/m³ cho tỷ lệ sống của ấu trùng tôm càng xanh giai đoạn PL cao nhất (65 ± 2%), khác biệt rất có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức ĐC (19 ± 2%) và các nghiệm thức còn lại (dao động từ 25 - 46%) và tỷ lệ sống của ấu trùng cũng khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa hai phương pháp chiết dịch Bạch hoa xà./.

Tài liệu tham khảo

- [1]. Bộ Y tế (2008), *Kỹ thuật bào chế và sinh dược học các dạng thuốc*, tập II, NXB Y học Hà Nội.
- [2]. Trương Thị Đẹp, Nguyễn Thị Thu Hằng, Nguyễn Thị Thu Ngân và Liêu Hồ Mỹ Trang (2007), *Thực vật dược*, NXB Giáo dục, 143 trang.
- [3]. Nguyễn Tuấn Quang (2003), *Nghiên cứu thành phần hóa học của cây Bạch hoa xà (Plumbago zeylanica)*, Luận văn tốt nghiệp dược sỹ đại học, Khoa Dược liệu, Trường Đại học Y Hà Nội.
- [4]. Nguyễn Thanh Phương, Trần Ngọc Hải, Trần Thị Thanh Hiền và Marcy N. Wilder (2003), *Nguyên lý và kỹ thuật sản xuất giống tôm càng xanh (Macrobrachium rosenbergii)*, NXB Nông nghiệp, 127 trang.
- [5]. Bùi Quang Tê, (2006), *Giáo trình bệnh học thủy sản*, Viện Nghiên cứu Nuôi trồng Thủy sản I.
- [6]. Phùng Thị Kim Thu (2014), Phát triển tôm càng xanh bền vững, *Bản tin thủy sản VASEP*, ngày 23/6/2014.

USING EXTRACTED SOLUTION FROM *Plumbago zeylanica* L. ON *Macrobrachium rosenbergii* LARVAL REARING

Summary

The study was conducted to assess the influence of the extraction method and a dosage extract from *Plumbago zeylanica* added in the water rearing *Macrobrachium rosenbergii* larvae. *Plumbago zeylanica* was extracted by two methods: (i) boiling the leaves in distilled water and (ii) soaking them in ethanol 70%. Solution *Plumbago zeylanica* used of four dosages 0 (control), 200, 300 and 400 g/m³. The results showed that, added extracted solution *Plumbago zeylanica* in larval rearing water helped increase the survival rate of postlarvae, reduce the risk of certain groups of ectoparasites, partly increasing productivity in *Macrobrachium rosenbergii* larvae rearing.

Keywords: Ectoparasites, Larval rearing, *Macrobrachium rosenbergii*, *Plumbago zeylanica*.

Ngày nhận bài: 12/4/2016; Ngày nhận lại: 27/7/2016; Ngày duyệt đăng: 09/12/2016.