

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
TRƯỜNG ĐẠI HỌC VINH

Tạp chí
KHOA HỌC
JOURNAL OF SCIENCE

CÁC NGÀNH KHOA HỌC TỰ NHIÊN
NATURAL SCIENCES

TẬP XXXVI - SỐ 2A - 2007

MỤC LỤC

CONTENTS

	Trang
1 Nguyễn Hoa Du, Đinh Anh Hoàng - Tổng hợp dẫn xuất p-dimetyl aminobenzandehit thiosemicacbazon, phức chất của nó với Cu(II) và hoạt tính sinh học của chúng. Synthesis p-dimethyl aminobenzaldehyd thiosemicarbazone, it's complex with Cu(II) and their bioactivities.	1
2 Bùi Thị Minh Nguyệt, Nguyễn Thị Lương Thiện, Trần Đình Thắng - Các hợp chất flavonoit từ lá cây Dứa dại trâu (<i>Melodorum fruticosum</i> L.) ở Việt Nam. Flavonoids from leaves of <i>Melodorum fruticosum</i> L. in Viet Nam	7
3 Lê Đức Giang, Phạm Hữu Lý - Biến tính tăng cường độ bền của nhựa epoxy bằng cao su thiên nhiên lỏng có nhóm hydroxyl cuối mạch. Modification and toughness of epoxy resin with hydroxyl terminated liquid natural rubber.	13
4 Mai Văn Chung - Phytohormones in defense response of pea (<i>Pisum sativum</i> L.) to pea phid (<i>Acyrtosiphon pisum</i> Harris) ingestion. Một số hooc-môn thực vật trong phản ứng bảo vệ của đậu (<i>Pisum sativum</i> L.) đối với rệp hại đậu (<i>Acyrtosiphon pisum</i> Harris).	20
5 Ngô Xuân Lương, Trần Đình Thắng - Các hợp chất flavonoit từ cây Giẻn lán (<i>Xylopia poilanei</i> Ast) ở Việt Nam. Flavonoids from <i>Xylopia poilanei</i> in Vietnam.	27
6 Nguyễn Văn Hưng, Ngụ Sỹ Lương, Nguyễn Thị Như Quỳnh, Nguyễn Hữu Hiếu - Ảnh hưởng của Y^{3+} đến cấu trúc và hoạt tính quang xúc tác của bột Y-TiO ₂ kích thước nano điều chế bằng phương pháp thủy phân. Effect of Y^{3+} on structure and photocatalytic activity of nanosized Y-TiO ₂ powders synthesized by hydrolysis method.	33
7 Đỗ Ngọc Đài - Tài nguyên cây thuốc họ Na (Annonaceae) ở Việt Nam. Resources of Medicinal plants of Annonaceae in Vietnam	39
8 Nguyễn Hạnh Trang, Phạm Đức Trục, Stephen F. Lincoln - Synthesis of d/l-tryptophane substituted polyacrylic acid for enantioselective study with beta-cyclodextrin.	52
9 Trịnh Xuân Gián, Nguyễn Khắc Nghĩa, Võ Thị Hòa, Đinh Thị Trường Giang - Nghiên cứu các điều kiện tạo phức và đặc điểm phức hấp phụ để xác định vết cadimi (cd) bằng phương pháp von-ampe hòa tan hấp phụ sử dụng 2,5 - dimercapto - 1, 3, 4 - thiadiazole(DMTD). A research on conditons and features of adsorbed complex formation for	60

- determination of cadmium traces by adsorptive stripping voltammetry using 2,5 - dimercapto - 1, 3, 4 - thiadiazole (DMTD).
- 10 **Nguyễn Xuân Dũng, Lưu Minh Đại** – Nghiên cứu một số đặc trưng và xúc tác oxy hóa M-xylen của perovskit $\text{LaCr}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$. 67
Study on characterizations of $\text{LaCr}_{0.5}\text{Mn}_{0.5}\text{O}_3$ perovskite for M-xylene oxidation.
 - 11 **Ngô Xuân Lương, Thiều Thị Thủy** – Phân lập và xác định cấu trúc một hợp chất từ cây Cù đèn hoa râm (*Croton cascarilloides* Raeusch) ở Việt Nam. 73
Isolation and structure elucidation of some compounds from the leaves of *Croton cascarilloides* in Vietnam.
 - 12 **Phan Thị Hồng Tuyết, Nguyễn Thị Giang** – Tổng hợp, nghiên cứu cấu trúc của phức chất Cu(II) với thiosemicarbazone diacetylmonoxim. 78
Synthesis and characterization of Cu(II) complex of diacetylmonoxim thiosemicarbazone.
 - 13 **Phan Thị Hồng Tuyết, Trần Đình Thắng** – Nghiên cứu xác định hàm lượng Pb, Cd, Cu, Zn trong một số loài Nhuyễn thể ở các vùng sông, biển Nghệ An. 82
Determination heavy metal concentrations in tissues of some bivalve *Mollusc* in different places of Nghe An province.
 - 14 **Lê Thị Phương Quỳnh, Nguyễn Thị Mai Hương, Phạm Quốc Long, Nguyễn Tiến Đạt** – Ảnh hưởng của nhiệt độ sấy tới hàm lượng epigallocatechin gallate (EGCG) trong chế biến lá chè xanh. 88
Influence of temperature on epigallocatechin gallate contents in the green tea production.
 - 15 **Dương Thị Thủy, Lê Thị Phương Quỳnh, Đặng Đình Kim, Hồ Tú Cường** – Cấu trúc quần xã và phân bố của quần xã silic bám trong môi trường nước hệ thống sông Nhuệ - Đáy. 93
Community structure and distribution of periphytic diatoms in Nhue- Day River system.
 - 16 **Vũ Hữu Hiếu, Lê Thị Phương Quỳnh, Dương Thị Thủy, Hồ Tú Cường** – Hàm lượng Silic hòa tan trong nước thải sản xuất công nghiệp trong lưu vực sông hồng. 99
Dissolved silica contents in industrial wastewater in the red River basin.
 - 17 **Bùi Thị Minh Nguyệt, Trần Đình Thắng** – Các hợp chất diterpenoit từ lá cây Na (*Annona squamosa* L.) ở Việt Nam. 106
Diterpenoids from leaves of *Annona squamosa* L. in Vietnam.
 - 18 **Nguyễn Hoa Du, Lâm Minh Sơn** – Tổng hợp, nghiên cứu và thử hoạt tính sinh học phức chất của Zn(ii) với thiosemicarbazone metylisobutylxeton. 112
Synthesis, characterization and bioactive assay of Zn(II) complex of methylisobutylketon thiosemicarbazone.
 - 19 **Hoàng Văn Lựu, Nguyễn Văn Thanh, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Cao Thị Hải Yến** - Tách và xác định cấu trúc các hợp chất triterpenoit, flavonoit từ rễ cây vòi (Cleistocalyx operculatus (Roxb.) Merr. et Perry) ở Nghệ An. 118
Isolation and structure determination of triterpenoid and flavonoid compounds from the roots of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr. et Perry from Nghe An.
 - 20 **Cao Văn Hoàng, Trịnh Xuân Giản, Đinh Thị Trường Giang** – Determination of trace metals by anodic stripping voltammetry using a bismuth-modified nano 125

silver and carbon nanotube electrode.

Phân tích lượng vết một số kim loại bằng phương pháp von-ampe hòa tan sử dụng điện cực màng bitmut biến tính trên nền điện cực nano bạc và ống cacbon nano.

- 21 **Bùi Tân Nghĩa, Trần Thị Ngọc Thảo, Phan Thanh Sơn Nam** – Heck reactions of aryl bromides using palladium catalyst immobilized on magnetic nanoparticles under microwave irradiation. 134
Nghiên cứu sử dụng xúc tác palladium cố định trên chất mang nano từ tính cho phản ứng heck của các dẫn xuất aryl bromides trong điều kiện vi sóng.
- 22 **Nguyễn Thị Chung, Nguyễn Ngọc Linh** – Phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất từ lá cây Huyền diệp (*Polyalthia longifolia* var. *pendula* Hort.) ở Nghệ An. 144
Isolation and structure elucidation of some compounds from *Polyalthia longifolia* var. *pendula* Hort. in Nghe An.
- 23 **Nguyễn Văn Phú** – Ảnh hưởng của các dòng điện bơm lên xung phát trong hoạt động của laser bán dẫn phản hồi phân bố hai ngăn. 149
The influence of injection currents on pulses in operation of distributed feedback with two sections.
- 24 **Ngô Hồng Ánh Thu, Vũ Công Thắng, Vũ Thị Bích Ngọc, Trịnh Lê Hùng** – Xử lí nước thải lò mổ bằng phương pháp sinh học. 156
Biological treatment of slaughterhouses wastewater.
- 25 **Võ Thị Việt Dung, Nguyễn Xuân Trung, Lưu Văn Bôi** – Sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng tối ưu hóa quá trình chuyển hóa este mỡ lợn để tách và xác định các axit béo. 164
Optimization of the esterification process of pork fat for separation and determination of fatty acids using response surface methodology.
- 26 **Nguyễn Ngọc Hiền, Hoàng Thị Loan** - Ảnh hưởng của caffeine trong cà phê lên một số chỉ tiêu sinh lí, sinh hóa của sinh viên trường Đại học Vinh. 172
Effects of coffee consumption on indicators physiological and biochemistry in Vinh University students.
- 27 **Huỳnh Thanh Sơn, Trần Thị Thu Phương, Trương Thanh Tâm, Nguyễn Thị Việt Nga, Võ Viễn** - Hấp phụ axit benzoic trên MCM-41. 184
.Adsorption of benzoic acid on MCM-41.
- 28 **Nguyễn Văn Phú** - Ảnh hưởng của một vài tham số cấu trúc lên đường cong lưỡng ổn định quang học trong môi trường tuần hoàn phi tuyến. 192
The influence of some structure parameters on hysteresis curves of optical bistability in nonlinear periodic medium.
- 29 **Cao Tiến Trung** - Sử dụng phương pháp mô học trong việc xác định các giai đoạn trong chu kì sinh sản ở nhông cát (*Leiolepis reevesii* (Gray, 1831)) ở các tỉnh Bắc Trung Bộ. 197
Applying musces in identify productive stages of butterfly lizard *Leiolepis reevesii* (Gray, 1831) in provinces in North Central Vietnam
- 30 **Lê Thị Hồng Nhan, Vương Ngọc Chính, Cao Minh Trí, Phan Thanh Sơn Nam** - Preparation of 'submicron bixin' from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. 203
Nghiên cứu điều chế 'submicron bixin' từ hạt điều nhuộm (*Bixa orellana* L.).

- 31 **Nguyen Quang Long, Chris Salim, Hirofumi Hinode** - A study on co-adsorption of NO/O₂ and C₃H₆/O₂ on CeO₂ using drifts. 211
Nghiên cứu sự hấp phụ đồng thời NO/O₂ và C₃H₆/O₂ trên CeO₂ bằng phương pháp drifts.
- 32 **Đào Thị Thanh Xuân, Nguyễn Thị Hồng, Lê Ánh Tuyết** - Sinh tổng hợp protease ngoại bào từ nấm kí sinh côn trùng *Beauveria*. 218
Production of extracellular protease by entomopathogenic fungus *Beauveria*.
- 33 **Trịnh Thị Huân, Nguyễn Hữu Đình** - Tổng hợp Arylhydrazin chứa vòng Furoxan đi từ Eugenol trong tinh dầu Hương nhu. 225
Synthesis of arylhydrazine containing furoxan ring starting with eugenol isolated from *Ocimum sanctum* L. essential oil
- 34 **Nguyễn Xuân Dũng, Phan Thị Minh Huyền, Đào Văn Lập** - Tổng hợp oxit zno có kích thước nanomet bằng phương pháp đốt cháy sử dụng tác nhân glyxin. 232
Synthesis of nano particle zinc oxide by the combustion method using glycine as a gel formation reagent.
- 35 **Le Thanh Dung, Huynh Tan Chien, Huynh Thi Nhu Nuynh, Dang Huynh Giao** - Carboxylic ligands containing amide groups – potential linkers for construction of new mofs: synthesis and characterization. 240
Các ligand carboxylic chứa nhóm amide - linker tiềm năng trong tổng hợp vật liệu mofs mới: Nghiên cứu tổng hợp và phân tích đặc trưng cấu trúc.
- 36 **Trần Đăng Thạch, Lê Văn Hạc, Nguyễn Xuân Hoàn, Nguyễn Văn Hùng** - Nghiên cứu thành phần hoá học cây Bù tru (*Uvaria grandiflora* Roxb. & Hornem), họ Na (Annonaceae). 247
Chemical constituents of the *Uvaria grandiflora* Roxb. & Hornem (Annonaceae).
- 37 **Lê Xuân Quế, Lục Văn Thụ** - Nghiên cứu quá trình ức chế ăn mòn thép xây dựng của EGCG chè xanh. 252
Study on inhibing construction steel corrosion of EGCG extracted from green Tea byproduct.
- 38 **Nguyễn Trung Dũng, Garmonov Sergey Yurevich** - Sử dụng phương pháp sắc kí lỏng cao áp (HPLC) xác định hàm lượng mesalazin trong dung dịch sinh học. 259
Determination of mesalazine in human urine by HPLC.
- 39 **Võ Triều Khải, Mai Duy Hiền, Đinh Quang Khiếu, Trần Thái Hòa** - Nghiên cứu tổng hợp nano oxit kẽm bằng phương pháp kết tủa có sự hỗ trợ vi sóng và thủy nhiệt. 266
Study on synthesis of nano zinc oxide by untrasonic assisted precipitation and hydrothermal methos.
- 40 **Hoa Phan, Kirill Kovnir, Jordan M. Hoyt, Michael Shatruck** - Spin crossover in Fe(II) complexes of 2,2'-biimidazole and its alkylated derivatives. 273
- 41 **Nguyễn Thị Giang An, Đồng Văn Quyền, Đinh Duy Kháng, Lê Thị Dung Hòa** - Phát hiện sự xâm nhiễm của Monodon baculo virus (MBV) trên tôm sú bằng kĩ thuật hóa mô. 283
Appilcation of histological method for detection and characterization of MBV in infected *Penaeus monodon*.
- 42 **Hoàng Hải Hiền, Hoàng Văn Lưu, Lê Đức Giang, Nguyễn Vĩnh Trị, Bùi** 291

Chương - Khảo sát khả năng kháng iot của 2 loại cao su blend Nr/Sbr và Nr/Nbr.

Prospecting ability to iodine resistant of two rubber blend Nr/Sbr and Nr/Nbr.

- 43 **Nguyễn Quang Tùng, Đặng Đình Bạch, Mai Tuyên, Vũ Thị Thu Hà - Tác động của điều kiện phản ứng đến chuyển hóa axeton thành điaxeton ancol và mesityl oxit** 296
effect of reaction condition on the acetone transformation into diacetone ancol and mesityl oxide.
Effect of reaction condition on the acetone transformation into diacetone ancol and mesityl oxide.
- 44 **Lê Thị Hồng Hải, Trần Thị Đà - Điều chế dung dịch phức chất cacboxylat Cr, Mn, Cu và sử dụng chúng làm chất tạo màu trang trí cho gạch granit nhân tạo.** 302
Preparation of solutions containing carboxylate complexes of Cr, Mn, Cu and their use as colorant for decoration of artificial granites.
- 45 **Lê Thị Hồng Nhan - Đánh giá thành phần và tách chiết pectin từ xương rồng nopal tại Việt Nam.** 308
Composition evaluation and extracting pectin from nopal cactus in Vietnam.
- 46 **Lê Thị Hồng Nhan, Nguyễn Thị Xuân Hồng, Hồ Ngọc Mỹ Trang, Trần Đức Trọng - Xử lý nguyên liệu cho quá trình tách chiết chất màu từ đậu đen (*Vigna cylindrica* Skeels.).** 315
Preparation of materials for colorant extraction from blackbean (*Vigna cylindrica* Skeels.)
- 47 **Lê Thị Hồng Nhan, Đoàn Lê Phương Hà - Thử nghiệm ứng dụng tinh dầu nghệ trắng trong mỹ phẩm dưỡng da.** 322
Appication of aromatica essential oils in skincare products.
- 48 **Trịnh Xuân Giản, Lê Đức Liêm, Dương Thị Tú Oanh, Vũ Đức Lợi, Trịnh Hồng Quân - Investigation on electrochemical methods for trace metal speciation in natural seawater samples.** 329
Nghiên cứu những phương pháp điện hóa để phân tích lượng vết dạng kim loại trong một số mẫu nước tự nhiên.
- 49 **Lê Đặng Ngọc Thúy, Hoàng Văn Hòa, Nguyễn Phi Hùng - Nghiên cứu lý thuyết phản ứng giữa CH_3CHCH_2 và H_2X ($\text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{Se}$) trong pha khí bằng phương pháp hóa học lượng tử.** 335
Theoretical study for the reactions of CH_3CHCH_2 with H_2X ($\text{X} = \text{O}, \text{S}, \text{Se}$) in the gas-phase by quantum chemical method.
- 50 **Nguyễn Ngọc Hạnh, Lâm Hoa Hùng, Nguyễn Minh Thành - Hấp phụ Pb trên bentonite lâm đồng biến tính mgo.** 341
Adsorption of lead on mgo- modified lam dong bentonite
- 51 **Nguyễn Hoa Lư - Về một phương pháp tổng hợp hệ thống điều khiển thích nghi công nghệ trộn liên tục.** 349
On the method adaptive control system design for regular stirring processing technology

PHÁT HIỆN SỰ XÂM NHIỄM CỦA MONODON BACULOVIRUS (mbv) TRÊN TÔM SÚ BẰNG KỸ THUẬT HÓA MÔ

Nguyễn Thị Giang An¹, Đồng Văn Quyền², Lê Thị Dung Hòa³,
Đinh Duy Kháng²

¹Khoa Sinh học, Đại học Vinh

²Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Trung tâm quốc gia giống hải sản Nam bộ, Vũng Tàu

Liên hệ với tác giả: nguyengiangan@gmail.com

1. MỞ ĐẦU

Monodon baculovirus (MBV) là virus thuộc họ Baculoviridae, vật chất di truyền là DNA xoắn kép với khối lượng phân tử $80 - 100 \times 10^6$ Da [11]. Khi xâm nhiễm vào cơ thể vật chủ chúng sẽ tấn công vào tổ chức gan tụy làm cho gan tụy chuyển sang màu vàng nhạt đến màu nâu và hình thành thể ẩn (occlusion body), qua đó chúng ảnh hưởng đến quá trình chuyển hóa của cơ thể. Vì vậy, khi nhiễm virus này tôm thường kém ăn, hoạt động yếu, sinh trưởng chậm, có màu xanh tái hoặc xanh sẫm, còi cọc không lớn được nên bệnh này còn được gọi là bệnh còi, qua đó ảnh hưởng đến năng suất tôm nuôi [3, 9]. Đây là bệnh phổ biến ở tôm, mặt dù không gây chết hàng loạt, song tôm khi nhiễm MBV sẽ tăng nguy cơ bội nhiễm với các virus và vi khuẩn khác (tỉ lệ chết có thể lên tới trên 90%) và đây cũng là nguyên nhân gây sụp đổ ngành công nghiệp nuôi tôm ở Đài Loan năm 1986-1988 [5, 13]. MBV lần đầu tiên được Lightner và Redman phát hiện ở những mẫu tôm từ Đài Loan chuyển sang Mehico [11, 12], sau đó chúng được phát hiện ở các vùng nuôi tôm khác như ở Thái Lan [8], Australia [16], Ấn Độ [17, 14]. Ở Việt Nam đã có một số công trình công bố về sự phổ biến MBV với tỉ lệ nhiễm bệnh rất cao. Các khảo sát sự nhiễm MBV trên tôm giống ở các vùng khác nhau của Việt Nam cho thấy tỉ lệ nhiễm MBV trên tôm giống có thể dao động từ 46 đến 100% [4, 7, 6]. Virus này nhiễm vào tất cả các giai đoạn từ ấu trùng đến trưởng thành. Con đường truyền bệnh của virus thường là qua phân, thức ăn, nguồn nước và tôm mẹ nhiễm bệnh [5]. Môi trường, dinh dưỡng và các yếu tố khác gây sốc cho tôm có liên quan chặt chẽ đến sự nhiễm bệnh MBV [12, 5]. Trong điều kiện nuôi quảng canh bệnh MBV ít xuất hiện hơn, nuôi bán thâm canh và thâm canh bệnh MBV xuất hiện rất nghiêm trọng [15].

Việc chẩn đoán MBV đã được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau như tách gan tụy nhuộm malachite 0,05% và quan sát dưới kính hiển vi điện quang học, PCR, Real-time PCT, Western blot [9]. Các phương pháp này có độ nhạy và tính chính xác cao, nhưng không thể quan sát được sự tấn công của virus vào tế bào đích, mức độ tổn thương của tế bào do MBV gây ra và cũng không đánh giá được tỉ lệ tôm bị nhiễm bệnh trong đàn, từ đó có các biện pháp hợp lý nhằm

giảm thiểu những tổn thất về kinh tế cho các hộ nuôi tôm. Để khắc phục được điều này, chúng tôi đã áp dụng kỹ thuật hóa mô nhuộm với hematoxylin và eosin (H&E) [1] nhằm phát hiện sự tấn công của virus vào cơ quan đích, quan sát các giai đoạn hình thành thể ẩn trên mô gan tụy, mức độ tổn thương của tế bào, cũng như con đường giải phóng của thể ẩn ra ngoài môi trường và xác định tỉ lệ tôm bị nhiễm trong đàn.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Mẫu tôm sau giai đoạn ấu trùng 10 đến 23 ngày (PL10 – PL23) lấy từ trại giống xã Quỳnh Liên, huyện Quỳnh Lưu, tỉnh Nghệ An và Trung tâm giống hải sản Nam bộ - Vũng Tàu, được kiểm tra sự lây nhiễm MBV bằng kỹ thuật soi tươi.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Xác định MBV bằng kỹ thuật nhuộm mẫu tươi

Mỗi ao nuôi lấy khoảng 30 - 50 con tôm sau giai đoạn ấu trùng 10 đến 15 ngày (PL10 – PL15), đặt lên lam kính, nhỏ một giọt nước biển để mẫu không bị khô, dùng 2 kim nhọn, kim bên trái giữ phần mắt và anten, kim bên phải đặt lên đốt bụng thứ nhất, từ từ tách phần ngực ra khỏi phần bụng, gan tụy lộ ra ngoài, nhỏ 1 giọt Malachite green 0,5% lên phần gan tụy, dùng lamel đặt lên và quan sát dưới kính hiển vi.

2.2.2. Cố định mẫu tôm nhiễm MBV trong dung dịch Davison

Mẫu tôm post-larval (PL10 - PL15) còn sống hoặc đang tình trạng hấp hối được cố định trong dung dịch Davison với tỉ lệ mẫu:hóa chất = 1 : 10. Đối với tôm ấu trùng và tôm giống ngâm trực tiếp cả con, tôm lớn lấy tôm sống, cắt phần đầu ngực. Sau 24 giờ đến 72 giờ chuyển sang cồn 70%.

2.2.3. Kỹ thuật hóa mô

Mẫu được lấy ra khỏi dung dịch cồn 70%, tiến hành xử lý mẫu trong các nồng độ cồn khác nhau 70% (30 phút), 3 lần cồn 95% (30 phút/lần), 3 lần cồn 99,5% (30 phút/lần), sau đó qua 2 lần Chloroform và đúc mẫu trong parafin. Tổng thời gian xử lý mẫu là 12,5 giờ.

Mẫu đúc trong parafin được làm lạnh và được cắt bằng máy cắt Microtome với lát cắt từ 5-6 μm , cố định lên lam kính và nhuộm theo phương pháp Sheehan D.C và Hrapchak với thuốc nhuộm Hematoxylin và Eosin. Cuối cùng cố định tiêu bản bằng lamen dán keo Boume Canada.

2.2.4. Đọc tiêu bản xác định tỉ lệ và mức độ tôm nhiễm bệnh

Quan sát tiêu bản bằng kính hiển vi quang học với bội giác 10 $\times$ 20X và 10 $\times$ 40X. Mức độ cảm nhiễm được chia làm 3 mức độ:

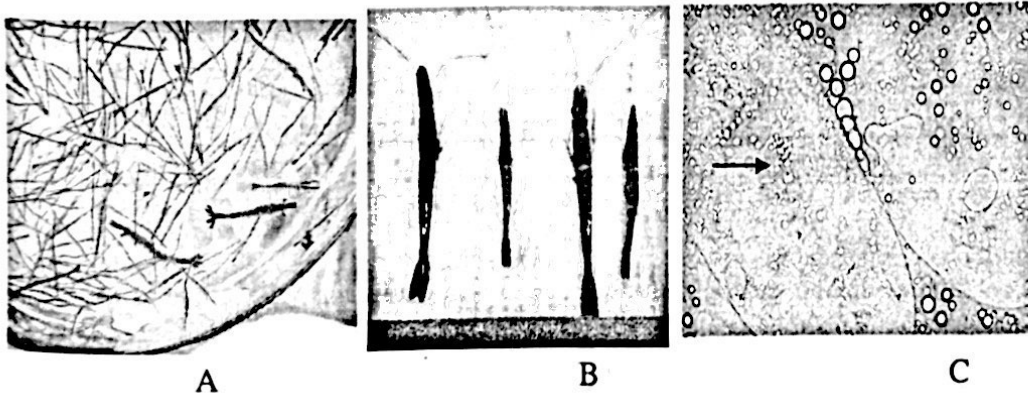
- Mức thấp: (+) tổng số nhân tế bào gan tụy nhiễm MBV < 30%.
- Mức độ trung bình (++) tổng số nhân tế bào gan tụy nhiễm MBV từ 30 - 60%.
- Mức độ cao (+++) tổng số nhân tế bào gan tụy bị nhiễm > 60%.

Tỉ lệ cảm nhiễm của tôm được đánh giá căn cứ vào tỉ lệ tôm bị nhiễm trong số tôm được kiểm tra [3].

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Sàng lọc mẫu tôm nhiễm MBV

Những mẫu tôm nghi ngờ bị bệnh MBV được tiếp tục nghiên cứu bằng cách tách gan tụy và nhuộm Malachite green 0,5%, kiểm tra dưới kính hiển vi quang học. Hình ảnh thu được bằng kính hiển vi quang học với vật kính 40X cho thấy, những tế bào bình thường bắt màu đậm với Malachite green, các tế bào nhiễm MBV có nhân trương to, bên trong nhân có từ 1 đến nhiều thể ẩn hình cầu không bắt màu hoặc bắt màu ít sáng rõ, lấp lánh (hình 1C). Qua quan sát các mẫu tôm post-larval chúng tôi phát hiện thấy, tôm bị nhiễm MBV có màu xanh nhạt, vận động kém, lờ đờ, trong cùng một đàn có các con to nhỏ không đều nhau (hình 1A, B).

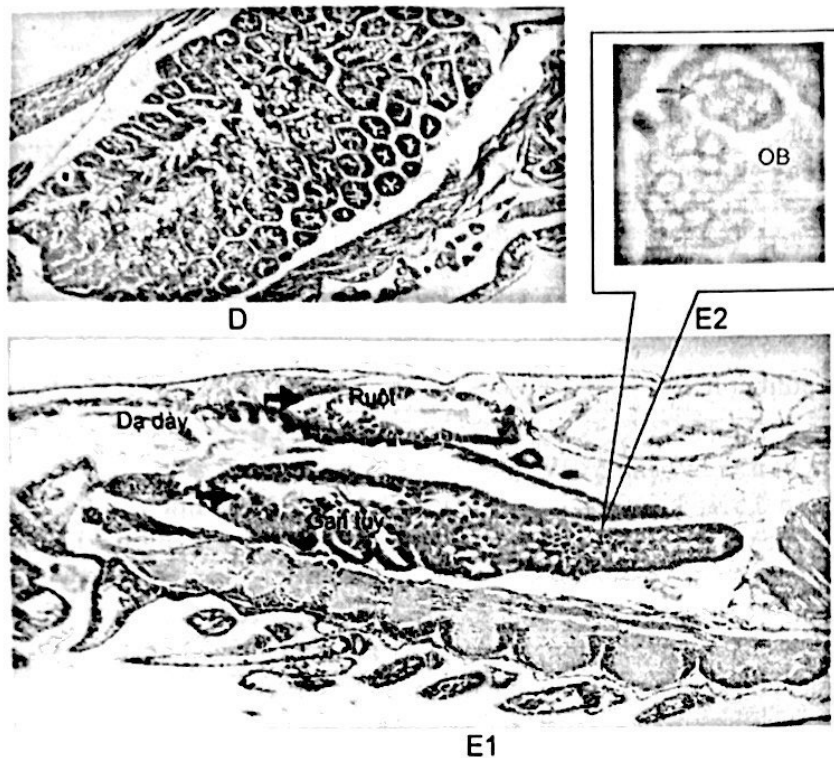


Hình 1. Những mẫu tôm bị còi được tách gan tụy và nhuộm Malachite green 0,5%.

A,B. Hình thái mẫu tôm bệnh. C. Các thể ẩn trong tế bào gan tụy của tôm nhiễm MBV có dạng hình cầu, không bắt màu. Mũi tên chỉ thể ẩn

3.2. Quan sát sự lây nhiễm MBV bằng mô bệnh học

Sau khi đã sàng lọc những mẫu tôm bằng kỹ thuật soi tươi, chúng tôi đã tiến hành xử lí và kiểm tra các mẫu bằng kỹ thuật hóa mô. Các mẫu tôm bệnh được xử lí trong dung dịch Davision qua đêm, sau đó cố định mẫu, cắt trong khối parafin và tiến hành nhuộm bằng Hematoxylin và Eosin như mô tả ở trên. Sau đó quan sát mẫu dưới kính hiển vi quang học ở vật kính 10X và 40X. Kết quả được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Gan tụy tôm sú cắt lát bằng microtome 0,5 μ m nhuộm Haematoxylin và Eosin (H&E). Các thể ản (OB) màu đỏ, nhân màu xanh tím, nhuộm màu H&E (độ phóng đại 10X, 40 X)

D: Tế bào gan của tôm bình thường; E1: Khối gan tụy và ruột bị nhiễm MBV, các thể ản OB (occlusion body) được hình thành (10X); E2: Các cấu trúc thể ản hình thành trong gan tụy (40X)

Dưới vật kính có độ phóng đại 100 lần và 400 lần, các thể ản của MBV trong tổ chức gan tụy được quan sát khá rõ ràng. Khi nhuộm H&E các thể ản có màu hồng đậm, những tế bào bình thường không nhiễm MBV có màu xanh tím, màu của Haematoxylin, trên khối gan có những khoang màu trắng là các hạt lipid (hình 2D). Quan sát trên kính hiển vi chúng tôi thấy, MBV xuất hiện ở gan tụy và ruột trước của tôm (hình 2E1), chúng hình thành từ các thể ản OB (occlusion body) hình cầu (hình 2E2). Kết quả này phù hợp với công bố của Lightner và Redman, trong nghiên cứu của mình hai ông đã chỉ ra rằng MBV chủ yếu lây nhiễm qua đường ăn uống, vì thế sau khi vào cơ thể vật chủ chúng sẽ xâm nhiễm vào đường tiêu hóa và khu trú ở tổ chức gan tụy, ruột. Để tránh được sự phân giải và tồn tại lâu trong các điều kiện môi trường chúng tổng hợp protein nền gọi là polyhedrin bao bọc bên ngoài virion được gọi là thể ản (occlusion body) [11].

3.3. Các dạng tồn tại khác nhau của thể ản

Khi qua sát cấu trúc tế bào bị nhiễm MBV chúng tôi phát hiện ra có 2 dạng thể ản được hình thành (hình 3). Một dạng gồm nhiều tinh thể hình đa giác được hình thành trong nhân tế bào và một dạng chỉ có một thể ản to tròn chiếm trong cấu trúc của tế bào. Theo công bố của Ramasamy và cộng sự năm 2000, MBV tồn tại trong tế bào gan tụy dưới dạng 2 dạng thể ản, một dạng có các hạt tinh thể polyhedrin xếp hàng lưới mắt cáo là các khối đa diện nằm cách

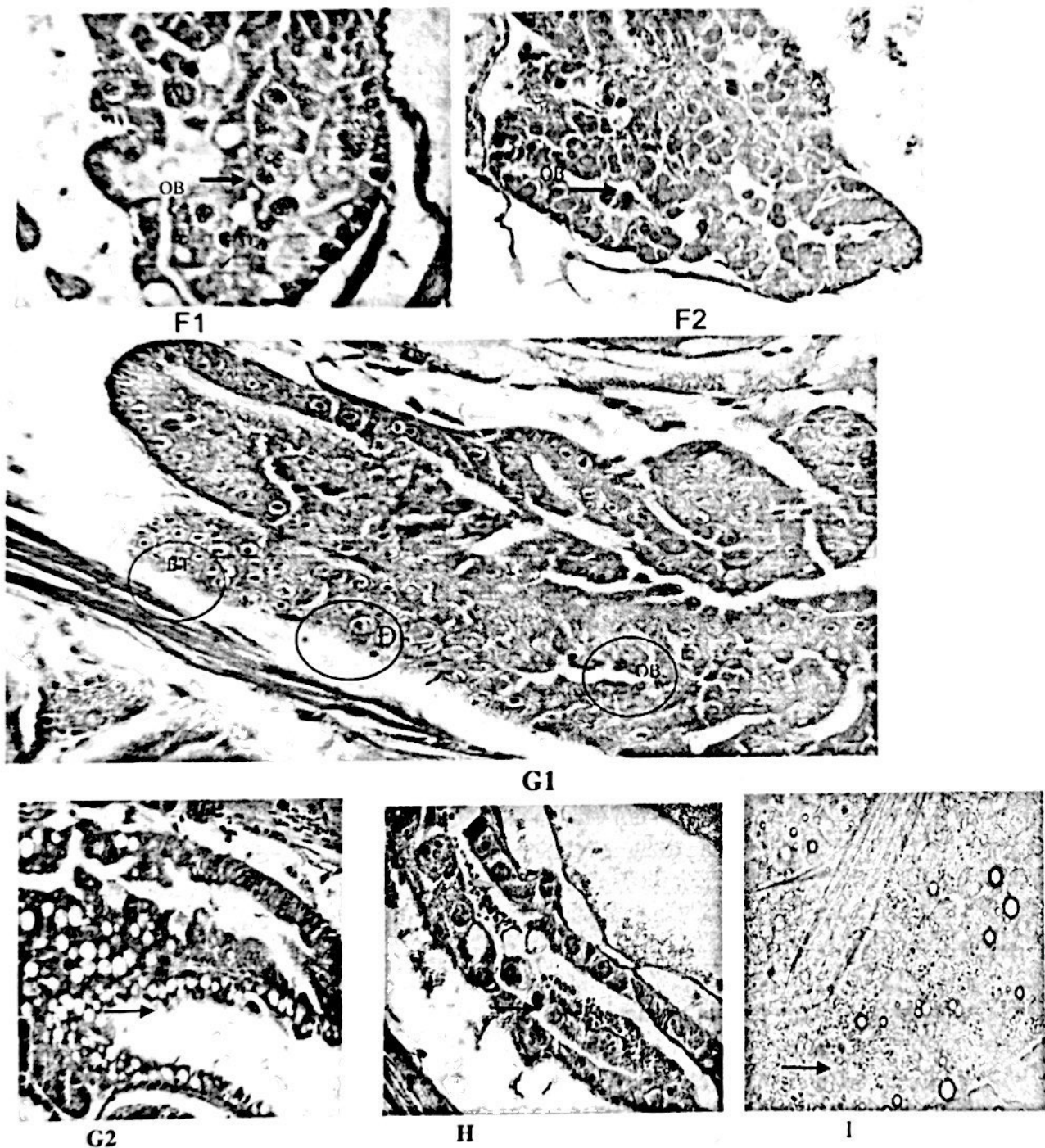
nhau 5 - 7 μm bên trong có virion hình que kích thước $267 \times 78 \text{ nm}$ và dạng thứ 2 là dạng hạt chứa các thể không trong suốt đường kính 12 μm chứa các virion trần kích thước $326 \times 73 \text{ nm}$. Khi quan sát các cấu trúc này dưới kính hiển vi điện tử Bonami đã mô tả các thể ẩn này được hình thành từ các tiểu thể là những khối cầu rỗng xếp với nhau thành hình hoa thị [2, 17].

3.4. Sự biến đổi tế bào ở các giai đoạn virus xâm nhiễm khác nhau

Với các lát cắt của gan tụy ở các giai đoạn khác nhau, chúng tôi thu được các hình ảnh tế bào gan tụy biến đổi khác nhau, có thể đây là các giai đoạn xâm nhiễm và nhân lên trong vòng đời của virus. Hình ảnh 2 quan sát ở G1 (BT) là những tế bào gan bình thường nhân nằm ở vị trí trung tâm, bắt màu xanh tím với thuốc nhuộm Heamatoxylin. Cũng trong hình G1 virus bắt đầu xâm nhiễm vào trong nhân tế bào, tế bào bắt đầu trương phồng lên, rối loạn cấu trúc của tế bào, đẩy nhân về một phía của tế bào (Đ), đây được xem là giai đoạn đầu tiên của thể ẩn. Giai đoạn tiếp theo, nhân trương phồng lên gấp nhiều lần so với tế bào bình thường, màng nhân tiêu giảm, thể ẩn (OB) hình cầu được hình thành trong nhân tế bào, khi nhuộm H&E thể ẩn bắt màu với Eosin tạo nên có màu hồng đậm. Tương tự, quan sát thể ẩn ở hình G2 cho thấy, sau khi phá hủy cấu trúc tế bào, các virion tự do giải phóng, thể ẩn cũng được giải phóng ra khỏi tế bào chúng để lại những hốc rỗng trên mô tế bào gan tụy, nhiều khả năng đây là giai đoạn cuối của quá trình xâm nhiễm các tế bào (G2) đây chính là giai đoạn gây tổn thương nặng nề cho gan. Trong cơ thể, gan có vai trò vô cùng quan trọng, là nơi thực hiện chức năng chuyển hóa. Vì vậy, khi gan bị tổn thương, các chức năng chuyển hóa sẽ bị rối loạn, ngăn cản quá trình lột xác của tôm. Vì thế đây là nguyên nhân chết với tỉ lệ rất cao ở tôm post-larval hoặc nếu sống sót thì khả năng phát triển của tôm cũng kém đi, gây nên hiện tượng còi cọc. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ramasamy và Vicker. Các tác giả này cho rằng, MBV tồn tại trong cơ thể vật chủ có 3 giai đoạn, giai đoạn đầu không có sự biến đổi về hình thái tế bào nên rất khó phát hiện ra, lúc này chỉ có hiện tượng rối loạn chức năng trong tế bào, giai đoạn tiếp theo bắt đầu có sự suy biến tế bào, nhân và tế bào chất của tế bào gan tụy bắt đầu tiêu giảm, thể ẩn bắt đầu xuất hiện và virion vùi bên trong. Giai đoạn cuối cùng các thể ẩn bung ra, virion giải phóng vào khoang ruột để lại các khoang trống trên các tổ chức [17, 20].

3.5. Quan sát sự giải phóng của thể ẩn qua đường ruột và phân

Khi các thể ẩn bung ra chúng di chuyển theo ống gan tụy đổ vào ruột sau và di chuyển ra ngoài môi trường (hình 3H). Tiếp tục xét nghiệm các mẫu phân của tôm nhiễm MBV bằng phương pháp soi tươi nhuộm Malachite green 5% chúng tôi phát hiện có rất nhiều các thể ẩn được giải phóng theo phân (I). Điều này phù hợp với các công bố trước đây của Liao 1992. Chính sự lây nhiễm theo con đường này kết hợp với bản năng ăn thịt đồng loại của tôm đã làm tăng tỉ lệ tôm bị nhiễm MBV trong đàn [10]. Theo Chen et al 1989 các virus tự do giải phóng ra ngoài môi trường sẽ tạo thành các nang bào kín có trong phân tôm và tồn tại rất lâu trong đáy ao. Tôm ăn phải những virus trong nang bào sẽ bị nhiễm bệnh. Trong các trại giống tôm mẹ bị nhiễm MBV sẽ truyền sang cho tôm con qua phân, nếu như rửa thật sạch bằng nước biển sẽ giảm được sự lây nhiễm virus theo con đường này [19].



Hình 3. Dưới kính hiển vi quang học có độ phóng đại 400X có 2 dạng thể ẩn tồn tại khác nhau trong gan tụy tôm sú nhiễm bệnh MBV

- F1: Tế bào gan nhiễm MBV hình thành loại đa thể ẩn trong một tế bào.
 F2: Tế bào gan bị nhiễm MBV hình thành một thể ẩn OB (occlusion body)
 G1: Tế bào bị nhiễm MBV nhân trương phồng lên so với tế bào bình thường, dòn về một bên.
 G2: Thể ẩn giải phóng để lại những khoang rỗng trên mô gan tụy.
 H: Các thể ẩn MBV được giải phóng ra khỏi gan tụy và theo ruột thoát ra ngoài.
 I: Lấy mẫu phân ượt sợi tươi thấy rất nhiều các thể ẩn

4. KẾT LUẬN

Để phát hiện sự xâm nhiễm của MBV trên tôm sú chúng tôi đã sử dụng kỹ thuật hóa mô, với các lát cắt ngang các tổ chức cơ thể của tôm post-larval chúng tôi thấy sự xuất hiện các thể ẩn trong gan tụy và ruột trước của tôm. Đồng thời sự tồn tại của thể ẩn ở hai dạng khác nhau và các giai đoạn xâm nhiễm của MBV trong tế bào gan tụy, sự giải phóng của các thể ẩn qua phân đã được minh chứng rõ sự xâm nhiễm MBV trên tôm sú.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alday de Graindorge V., Flegel T. W. - Diagnosis of shrimp diseases with emphasis on the black tiger prawn *Penaeus monodon*. Multimedia Asia, Bangkok, 1999.
2. Bonami J. R., Aubert H., Mari J., Poulos B. T., Lightner D. V. - The polyhedra of the occluded baculoviruses of marine decapod crustacea: A unique structure, crystal organization, and proposed model. J. Struct Biol. 120 (2) (1997) 134-145.
3. Bùi Quang Tề - Bệnh của tôm và biện pháp phòng trị, NXB Nông nghiệp, 2003.
4. Bùi Quang Tề - Bệnh penaeus monodon baculovirus (MBV) của tôm sú nuôi ở các tỉnh phía nam, Báo cáo hội nghị khảo sát nguyên nhân gây chết tôm nuôi tại khu vực phía nam và giải pháp phòng trừ để phát triển nghề nuôi tôm, 2004, pp. 1-18.
5. Chen S. N., Chang P. S., Kou G. H. - Observation on Monodon Baculovirus (MBV) in culture shrimp in Taiwan, Fish Pathology 24 (2) (1989) 189-195.
6. Dang Thi Hoang Oanh, Nguyen Thanh Phuong - Peter J Walker, Richard AJ Hodgson and Nigel Preston - Prevalence of white spot syndrome virus (WSSV) and monodon baculovirus (MBV) infection in *Penaeus monodon* postlarvae in Viet Nam, Diseases in Asian Aquaculture V, Fish Healthy Section, Asian Fisheries Society, Manila, 2005, pp. 395-404.
7. Đỗ Thị Hòa - Bệnh Monodon type baculovirus (MBV) ở tôm he, Bệnh học thủy sản, NXB Nông nghiệp, 2004, tr. 4-204.
8. Fegan D. F., F. T. W., Sriurairatana S., Waiakruta M. - The occurrence, development and histopathology of monodon baculovirus in *Penaeus monodon* in Southern Thailand, Aquaculture 96 (1991) 205-217.
9. Flegel T. W. - Detection of major penaeid shrimp viruses in Asia, a historical perspective with emphasis on Thailand, Aquaculture 258 (2006) 1-33.
10. Liao I. C., Su M. S., Chang C. F. - Diseases of *Penaeus monodon* in Taiwan: a review from 77 to 91, In: Fulks, W., Main, K.L. (Eds.). Diseases of Cultured Penaeid Shrimp in Asia and the United States. Oceanic Institute, Honolulu, HI (92) (2006) 113-137.
11. Lightner D. V., Redman R. M. - A baculovirus-caused of the penaeid shrimp, *Penaeus monodon*, J. Invertebr Patho 38 (1981) 299-302.
12. Lightner D. V. - A Handbook of Pathology and Diagnostic Procedures for Diseases of Penaeid Shrimp, World Aquaculture Society, Baton Rouge, La, 1996.
13. Lu C. C., Tang K. F. J., and Chen S. N. - Morphogenesis of the membranous labyrinth in penaeid shrimp cells infected with *Penaeus monodon* baculovirus (MBV), Journal of Fish Diseases 19 (1996) 357-336.

14. Manivannan S., Kennedy B., Karunasagar I., Karunasagar I. - Prevalence of monodon baculovirus in wild *Metapenaeus* species along the southwest coast of India, *Aquaculture* **232** (2004) 63–67.
15. Nash G., Anderson I. G., Shariff M. (1988) Pathological changes in the tiger Prawn *Penaeus monodon* Fabricius associated with culture in brackish water ponds developed from potentially acid sulphate soils. *Fish disease* 11:113-123.
16. Owens, Leigh, McElnea, Catriona, Snape, Natale, Harris, Lachlan, and Smith, Malcolm - Prevalence and effect of spawner-isolated mortality virus on the hatchery phases of *Penaeus monodon* and *P. merguensis* in Australia. *Dis Aquat Organ* **53** (2) (2003) 101-106.
17. Ramasamy P., Rajan P. R., Purushothaman V., Brennan G. P. - Ultrastructure and pathogenesis of *Monodon baculovirus* (Pm SNPV) in cultured larvae and natural brooders of *Penaeus monodon*, *Aquaculture* **184** (2000) 45–66.
18. Sheehan D. C., Hrapchak B. B. - *Theory and Practice of Histotechnology* C. V. Mosby Co., St.Louis, MO 2nd Edition, 1980.
19. Sano T., Nishimura, Oguma K., Momoyama K., and Takeno N. - Baculovirus infectivity trials on kuruma shrimp larvae, *Penaeus japonicus* of different age, *Fish shellfish Pathol* **43** (1985) 379-403.
20. Vickers J. E., Webb R., Young P. R. - *Monodon baculovirus* from Australia: ultrastructural observations, *Diseases aquatic organisms Dis. Aquat. Org.* **39** (2000) 196-176.

SUMMARY

APPLICATION OF HISTOLOGICAL METHOD FOR DETECTION AND CHARACTERIZATION OF MBV IN INFECTED *PENAEUS MONODON*

Monodon baculovirus (MBV) is a shrimp enteric virus that infect intestinal and hepatopancreatic epithelial cells and cause significant mortalities and depressed growth in infected larval, post-larval, and early juvenile stages of shrimp. This virus may cause a significant loss for shrimp aquaculture. Early detection of the virus plays an important role in controlling the virus infection. For this purpose, several methods including PCR, Real-time PCR, Western blot, ELISA have been developed. However, those methods cannot reflect the image of the virus infection and distribution in the tissues or organs of infected host. In this study, we used the histological method to determine the tissue distribution and histological lesions of MBV in infected *Penaeus monodon*. We found that the target organs of MBV in infected shrimp were fore-gut and hepatopancreas. We also found that MBV-infected hepatopancreatic cells exhibited a significant volume increase in the nuclei, which contained spherical, intranuclear occlusion bodies (OB). In addition, two types of occlusion bodies were observed. The level of OB present in tissues depends on the rate of MBV infection. Upon MBV invasion and destruction of hepatopancreas, OB were released and this led to the formation of large holes on the organs, then finally they moved into the environment as dung route through hepatopancreas tubes. Taken together, our data suggested that histology combined with other molecular techniques is an accurate and powerful method for detection and characterization of tissue distribution and histopathological lesions in MBV - infected shrimp.

Key words: *Monodon baculovirus*, *Penaeus monodon*, histology, diagnosis.