

ĐÁNH GIÁ HIỆU QUẢ CỦA CÁC LOẠI DỊCH CHIẾT THẢO DƯỢC TRONG VIỆC NÂNG CAO KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU CỦA TÔM CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) VỚI VI KHUẨN *Vibrio parahaemolyticus*

Lê Nguyễn Thiên Phúc¹, Nguyễn Minh Thành¹

TÓM TẮT

Nghiên cứu đánh giá hiệu quả 3 loại dịch chiết thảo dược: trầu không (*Piper betle*); rau má (*Centella asiatica*) và tỏi (*Allium sativum*) phối trộn vào chế độ ăn hoặc bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi trong cải thiện tỷ lệ sống và ức chế mật độ *Vibrio* spp. khi cảm nhiễm tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*. Ở thí nghiệm 1, tôm hậu ấu trùng (PL12) ở mỗi bể thí nghiệm được nuôi chuẩn bị bằng thức ăn phối trộn thảo dược tương ứng trong 30 ngày. Sau đó, tôm được cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* và tiếp tục nuôi thêm 15 ngày theo 3 nghiệm thức thức ăn có thảo dược (trầu không, rau má hoặc tỏi). Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Đối chứng dùng thức ăn không có thảo dược. Ở thí nghiệm 2, PL12 được nuôi chuẩn bị bằng thức ăn không trộn thảo dược trong 30 ngày và được cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*. Sau 24 giờ, các loại dịch chiết thảo dược được cho trực tiếp vào môi trường nuôi cũng theo 3 nghiệm thức và đối chứng không được bổ sung thảo dược. Tôm của tất cả các bể của thí nghiệm 2 tiếp tục được nuôi bằng thức ăn thông thường trong 15 ngày. Cả 2 thí nghiệm đều giúp nâng cao tỷ lệ sống và kiểm chế mật độ *Vibrio* spp. trong tôm một cách có ý nghĩa thống kê so với đối chứng ($P < 0,05$). Trong đó, thí nghiệm thảo dược bổ sung trong chế độ ăn cho kết quả nâng cao tỷ lệ sống và giảm mật độ *Vibrio* spp. ($P < 0,05$) so với thí nghiệm thảo dược bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi. Nghiên cứu cho thấy tiềm năng sử dụng thảo dược, đặc biệt trong chế độ ăn, trong cải thiện khả năng chống chịu của tôm chân trắng với *V. parahaemolyticus*.

Từ khóa: Tôm chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus*, thảo dược, tỷ lệ sống.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) đã được du nhập vào Việt Nam từ những năm 2000 và trở thành đối tượng chủ lực của ngành nuôi trồng thủy sản ở cả mô hình thâm canh và bán thâm canh [13]. Nuôi thâm canh mật độ cao tuy mang lại hiệu quả kinh tế to lớn nhưng cũng gây ra bệnh dịch làm thiệt hại kinh tế nghiêm trọng [11]. Vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* được xác định là một trong những tác nhân gây bệnh chính trên tôm nuôi tại nhiều quốc gia trong đó có Việt Nam [7], có thể kể đến bệnh đỏ thân [5] và bệnh hoại tử gan tụy cấp (Acute hepatopancreatic necrosis disease – AHPND) [19]. Trong bối cảnh đó, việc lạm dụng kháng sinh trong trị bệnh đã dẫn đến nhiều vấn đề như đa kháng thuốc và dư lượng kháng sinh cao trong môi trường, trực tiếp hay gián tiếp ảnh hưởng đến sức khỏe cộng đồng [11]. Do đó, dịch chiết thảo dược được xem như giải pháp thay thế đang ngày càng được quan

tâm và đã cho thấy hiệu quả trong cải thiện tỷ lệ sống, do chứa nhiều hợp chất chống oxy hóa và kích thích miễn dịch [15]. Một số nghiên cứu dùng dịch chiết tỏi để nâng cao khả năng kháng bệnh và hoạt tính enzyme gan tụy [1], hay thử nghiệm tỏi lên men về khả năng kháng khuẩn và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp (AHPND) [14]. Một số công bố khác sử dụng diệp hạ châu và gừng giúp tăng cường chỉ số miễn dịch và tỷ lệ sống của tôm chân trắng khi cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* [4].

Nước ta còn nhiều thảo dược bản địa, đã được sử dụng rộng rãi trong chăn nuôi mang đến nhiều lựa chọn sử dụng an toàn và tiềm năng trong tăng cường sức khỏe và phòng trị bệnh cho các đối tượng thủy sản. Nghiên cứu của Lê Nguyễn Thiên Phúc, Nguyễn Minh Thành (2022) cho thấy dịch chiết trầu không, rau má và tỏi bổ sung vào thức ăn đã nâng cao tăng trưởng, tỷ lệ sống và chất lượng thịt ở tôm thẻ chân trắng [9].

Nghiên cứu này bổ sung dịch chiết của ba loại thảo dược sẵn có tại địa phương vào thức ăn nuôi tôm chân trắng hoặc môi trường nuôi tôm, bao gồm: tỏi

¹ Trường Đại học Quốc tế, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh

(*Allium sativum*), rau má (*Centella asiatica*), trầu không (*Piper betle*). Mục tiêu của nghiên cứu là đánh giá hiệu quả của dịch chiết từ tỏi, rau má và trầu không bổ sung vào thức ăn hoặc môi trường nuôi trong việc nâng cao tỷ lệ sống và ức chế mật độ *Vibrio* spp. của thí nghiệm tôm chân trắng cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Khu thực nghiệm Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Quốc tế - Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

2.2. Vật liệu

2.2.1. Chuẩn bị vi khuẩn cảm nhiễm

V. parahaemolyticus trong nghiên cứu có nguồn gốc từ tôm chân trắng nhiễm AHPND tại các ao nuôi ở Thái Lan và được phân lập bởi Khoa Khoa học và Công nghệ, Đại học Suan Sunandha Rajabhat. Dòng thuần *V. parahaemolyticus* được cấy duy trì định kỳ trên môi trường thạch tryptic soy agar bổ sung 1% NaCl (TSA-NaCl) nhằm tránh tạp nhiễm. Vi khuẩn dùng cho cảm nhiễm được chuẩn bị theo phương pháp nuôi tăng sinh và thu tế bào bằng ly tâm [8]. Khuẩn lạc được chọn và nuôi tăng sinh (30°C, 150 rpm) trong môi trường lỏng tryptic soy broth bổ sung 1% NaCl (TSB-NaCl) đến khi đạt giai đoạn hậu pha log (xác định bằng phương pháp đo quang phổ ở 600 nm và so với đường chuẩn sinh trưởng). Tế bào vi khuẩn được thu bằng phương pháp ly tâm (2.000 g, 10 phút, 4°C), rửa sạch 2 lần với dung dịch phosphate-buffered saline (PBS) và pha loãng đến nồng độ CFU/mL cần dùng bằng TSB - NaCl. Nồng độ tế bào khuẩn này được kiểm tra chéo bằng cách pha loãng theo dãy nồng độ, cấy trên môi trường phân tích Mueller-Hinton (MH) (30°C, 48 giờ) và đếm khuẩn lạc.

2.2.2. Chuẩn bị dịch chiết các loại thảo dược và phối trộn dịch chiết vào thức ăn công nghiệp

Ba loại thảo dược: i) trầu không (*P. betle*); ii) rau má (*C. asiatica*); iii) tỏi (*A. sativum*) được tách chiết và trộn vào thức ăn công nghiệp như được miêu tả tại nghiên cứu của Lê Nguyễn Thiên Phúc, Nguyễn Minh Thành (2022) [9]. Mỗi loại thảo dược ở dạng tươi được rửa sạch, loại bỏ các cành thừa, cắt nhỏ, sấy khô ở 50°C trong 24 giờ. Thảo dược sau khi sấy được nghiền thành bột mịn. Bột thảo dược (250 g/loại thảo dược) được ngâm vào 1 L ethanol 95%

trong 7 ngày, sau đó được lọc lại 3 lần bằng giấy lọc Whatman kích cỡ 42 micron. Dung dịch sau lọc được tiếp tục loại bỏ dung môi ở 75°C bằng máy cô quay chân không Hei-VAP Precision (Heildolph, Đức). Các sản phẩm dịch chiết được lưu giữ ở 4°C cho đến khi được sử dụng. Thức ăn viên công nghiệp cho tôm chân trắng được sử dụng làm thức ăn nền để tạo ra ba loại thức ăn chứa thảo dược tương ứng với ba loại dịch chiết. Thành phần thức ăn phối trộn như sau: 80 mg dịch chiết, 10 g dầu mực, 1 kg thức ăn viên, 20 mL nước vô trùng. Thức ăn đã được trộn dịch chiết được đem sấy ở 50°C trong 24 giờ, được đóng vào túi kín khí và trữ ở 4°C.

2.2.3. Tôm sử dụng cho thí nghiệm 1

Hậu ấu trùng tôm chân trắng (PL12) có khối lượng trung bình $0,010 \pm 0,002$ g và chiều dài trung bình $9,0 \pm 0,5$ mm được thuần dưỡng ổn định ở độ mặn 12 ppt trong các bể composite 200 L. Sau đó tôm được nuôi bằng thức ăn công nghiệp đã được trộn các loại dịch chiết thảo dược. Tôm được nuôi trong các bể composite thể tích 100 L với mật độ 80 con/bể ở độ mặn 12 ppt. Tôm ở mỗi bể composite được cho ăn thức ăn trộn 1 loại thảo dược (trầu không hoặc rau má hoặc tỏi) và bố trí 3 bể nuôi cho thức ăn bổ sung 1 loại thảo dược. Tôm được cho ăn 2 lần/ngày vào 8 giờ và 14 giờ đến khi thỏa mãn bằng các loại thức ăn tương ứng. Thời gian nuôi cho giai đoạn chuẩn bị là 30 ngày.

2.2.4. Tôm sử dụng cho thí nghiệm 2

Hậu ấu trùng (PL12) có cùng nguồn gốc với tôm sử dụng cho thí nghiệm 1 cũng được nuôi bằng thức ăn công nghiệp nhưng không được trộn các loại thảo dược. Tôm cũng được nuôi trong các bể composite thể tích 100 L với mật độ 80 con/bể ở độ mặn 12 ppt. Thời gian nuôi là 30 ngày.

2.3. Bố trí thí nghiệm

2.3.1. Thí nghiệm 1: Đánh giá hiệu quả thảo dược bổ sung vào thức ăn lên tỷ lệ sống và mật độ *Vibrio* spp. của tôm cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*

Sau khi kết thúc giai đoạn chuẩn bị tôm thí nghiệm như mô tả ở mục 2.2.3, 50 cá thể tôm ở mỗi bể thí nghiệm được chọn ngẫu nhiên và tiến hành cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm [18] trong dung dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ($2,4 \times 10^7$ CFU/mL) [17] trong 15 phút. Sau đó, tôm và dung dịch khuẩn được cho trở lại bể thí nghiệm 100 L và

tiếp tục nuôi thêm 15 ngày bằng 3 nghiệm thức thức ăn có bổ sung thảo dược: trầu không, rau má và tỏi. Mỗi nghiệm thức thức ăn có bổ sung thảo dược được lặp lại 3 lần. Đối chứng được bố trí dùng loại thức ăn không bổ sung dịch chiết. Tỷ lệ sống và mật độ *Vibrio* spp. được thu thập như mô tả ở mục 2.4. Biểu hiện bệnh lý của tôm chết cũng được quan sát hàng ngày.

2.3.2. Thí nghiệm 2: Đánh giá hiệu quả thảo dược bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi lên tỷ lệ sống và mật độ *Vibrio* spp. của tôm cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*

Tôm được chuẩn bị như mô tả ở mục 2.2.4 có khối lượng trung bình $3,02 \pm 0,02$ g cũng được gây cảm nhiễm: 50 con/bể, cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm trong dung dịch vi khuẩn *V. parahaemolyticus* ($2,4 \times 10^7$ CFU/mL) trong 15 phút. Tôm đã gây cảm nhiễm và dung dịch khuẩn được bố trí trở lại các bể nuôi 100 L. Sau khi cảm nhiễm được 24 giờ, các loại dịch chiết thảo dược được cho trực tiếp vào các bể nuôi và luôn được duy trì (kể cả khi thay nước) ở nồng độ là 80 mg dịch chiết/bể trong suốt thời gian 15 ngày nuôi. Thí nghiệm 2 được bố trí với 3 nghiệm thức bổ sung trực tiếp dịch chiết thảo dược vào môi trường nuôi: trầu không, rau má và tỏi. Mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Đối chứng được bố trí nuôi tôm đã cảm nhiễm không được bổ sung các loại dịch chiết vào môi trường nuôi. Tất cả các bể đều cho ăn cùng loại thức ăn thông thường không bổ sung dịch chiết. Thí nghiệm 2 cũng thu thập tỷ lệ sống và mật độ *Vibrio* spp. tương tự như thí nghiệm 1.

Khối lượng tôm sau 30 ngày nuôi chuẩn bị cho thí nghiệm cảm nhiễm nhỏ hơn khối lượng tôm ở cùng giai đoạn trong thực tế sản xuất. Nguyên nhân là điều kiện nuôi của thí nghiệm như hệ thống nuôi, nguồn thức ăn tự nhiên và các yếu tố môi trường đều không tối ưu cho tôm tăng trưởng so với điều kiện nuôi thực tế.

2.4. Thu thập số liệu

2.4.1. Tỷ lệ sống

Tỷ lệ sống tôm sau cảm nhiễm được thu thập khi kết thúc thí nghiệm sau 15 ngày nuôi.

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{Số lượng tôm còn sống}}{\text{Số lượng tôm thả ban đầu}} \times 100$$

2.4.2. Phân tích mật độ *Vibrio* spp.

Ở cả 2 thí nghiệm, tôm được thu mẫu 3 lần (5 con/lần/bể) ở các thời điểm: trước khi bắt đầu thí nghiệm, ngày thứ hai sau cảm nhiễm và khi kết thúc thí nghiệm nhằm định danh *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp phân lập định danh trên môi trường thạch thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) [7] và xác định mật độ *Vibrio* spp. bằng phương pháp đếm khuẩn lạc [8]. Tôm có kích thước nhỏ nên toàn bộ cơ thể tôm được nghiền và pha loãng theo dãy nồng độ, trải trên đĩa thạch TCBS (30°C, 48 giờ) và đếm mật độ vi khuẩn tương ứng.

$$\text{Mật độ khuẩn (CFU/g)} = \frac{\text{Số lượng khuẩn lạc x hệ số pha loãng}}{\text{Khối lượng mẫu}} \times 100$$

2.5. Phân tích thống kê

Các giá trị trung bình và độ lệch chuẩn của các chỉ tiêu theo dõi được tính toán bằng phần mềm Microsoft Excel. Các nghiệm thức được so sánh thống kê bằng phương pháp ANOVA một yếu tố bằng phần mềm SPSS 22.0 cho hệ điều hành Windows. Các số liệu ở dạng % đều được chuyển đổi sang arsin của căn bậc 2 trước khi tiến hành phân tích thống kê.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tỷ lệ sống sau cảm nhiễm

Bảng 1. Tỷ lệ sống của tôm chân trắng sau cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*

Nghiệm thức	Thí nghiệm 1 (Thảo dược bổ sung thức ăn)				Thí nghiệm 2 (Thảo dược bổ sung môi trường nuôi)			
	Trầu không	Rau má	Tỏi	Đối chứng	Trầu không	Rau má	Tỏi	Đối chứng
Tỷ lệ sống (%)	56,67 $\pm 3,06^a$	56,00 $\pm 2,00^a$	45,33 $\pm 4,16^b$	23,33 $\pm 2,31^d$	32,67 $\pm 1,15^c$	33,33 $\pm 3,06^c$	34,00 $\pm 3,46^c$	22,00 $\pm 2,00^d$

Ghi chú: Số liệu trình bày giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n = 3$). Những chữ cái khác nhau trong cùng một hàng cho thấy khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Bảng 1 cho thấy, có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa các nghiệm thức khác nhau ($P < 0,05$), cũng như giữa thí nghiệm 1 và 2. Nhìn chung, việc sử dụng thảo dược bổ sung vào thức ăn hoặc bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi đều giúp nâng cao tỷ lệ sống (32,67 – 56,67%) và sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với đối chứng tương ứng (22,00 – 23,33%). Tuy nhiên, tôm nuôi bằng thức ăn có bổ sung thảo dược trước khi cảm nhiễm và tiếp tục cho ăn cùng loại thức ăn sau khi cảm nhiễm có tỷ lệ sống (45,33 – 56,67%) là cao hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với tỷ lệ sống của thí nghiệm bổ sung thảo dược trực tiếp vào môi trường nuôi (32,67 – 34,00%). Trong đó, tỷ lệ sống của nghiệm thức sử dụng thức ăn chứa trầu không và rau má là tương đương nhau (lần lượt là 56,67% và 56,00%) và cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với nghiệm thức sử dụng thức ăn bổ sung tỏi (45,33%). Riêng tỷ lệ sống của nghiệm thức đối chứng là tương đồng với các nghiệm thức trong cùng lĩnh vực [6], [7]. Quan sát cho thấy tôm có biểu hiện lơ dờ, giảm ăn và giảm hoạt động 1 ngày sau cảm nhiễm, đồng thời có dấu hiệu AHPND như vỏ mềm, gan tụy nhạt màu và bắt đầu chết nhiều trong giai đoạn 3-5 ngày sau cảm nhiễm, phù hợp với mô tả của Lightner và cs (2013) [10]. Hạn chế của nghiên cứu là chưa có điều kiện định danh tác nhân gây bệnh

AHPND bằng phương pháp PCR, điều cần được tiến hành cho những nghiên cứu sau này nhằm có một kết luận chính xác hơn.

Việc nâng cao tỷ lệ sống có được là do khả năng tăng cường sinh tổng hợp các protein tham gia vào miễn dịch như lysozyme, alkaline phosphatase hay nitrogen monoxide của thảo dược [20]. Điển hình như nghiên cứu bổ sung dịch chiết trà xanh vào nước nuôi sau cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* đã giúp tăng khả năng sống sót của tôm chân trắng. Cụ thể nhóm tác giả này thu được tỷ lệ sống của tôm được trị trực tiếp với trà xanh (50%) là tốt hơn đáng kể ($P < 0,05$) so với đối chứng (26,6%) [7]. Nghiên cứu tương tự sử dụng trực tiếp dịch chiết lá bàng cũng cải thiện tỷ lệ sống lên đến 60% [4]. Trong nghiên cứu này khi dùng trực tiếp thảo dược cũng thu được kết quả tương đồng trong việc nâng cao tỷ lệ sống so với đối chứng. Tuy nhiên, thí nghiệm bổ sung thảo dược vào chế độ ăn của tôm có tỷ lệ sống cao hơn nhiều so với bổ sung trực tiếp dịch chiết thảo dược vào môi trường nuôi. Điều này cho thấy tiềm năng ứng dụng các loại thảo dược này trong phòng trị bệnh trên tôm chân trắng.

3.2. Mật độ *Vibrio* spp.

Bảng 2. Mật độ *Vibrio* spp. của tôm chân trắng sau khi cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*

Nghiệm thức	Mật độ <i>Vibrio</i> spp. (CFU/g)					
	Thí nghiệm 1 (Thảo dược bổ sung thức ăn)			Thí nghiệm 2 (Thảo dược bổ sung môi trường nuôi)		
	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 15	Ngày 0	Ngày 2	Ngày 15
Trầu không	$2,00 \times 10^3$ $\pm 0,02 \times 10^{3a}$	$1,15 \times 10^5$ $\pm 0,15 \times 10^{5a}$	$5,27 \times 10^4$ $\pm 0,68 \times 10^{4a}$	$9,77 \times 10^3$ $\pm 0,19 \times 10^{3a}$	$2,16 \times 10^6$ $\pm 0,39 \times 10^{6d}$	$2,62 \times 10^5$ $\pm 0,28 \times 10^{5ab}$
Rau má	$3,32 \times 10^3$ $\pm 0,62 \times 10^{3a}$	$1,14 \times 10^5$ $\pm 0,07 \times 10^{5a}$	$5,00 \times 10^4$ $\pm 0,27 \times 10^{4a}$	$9,21 \times 10^3$ $\pm 0,34 \times 10^{3a}$	$1,62 \times 10^6$ $\pm 0,41 \times 10^{6c}$	$2,58 \times 10^5$ $\pm 0,08 \times 10^{5ab}$
Tỏi	$5,32 \times 10^3$ $\pm 0,61 \times 10^{3a}$	$2,61 \times 10^5$ $\pm 0,30 \times 10^{5ab}$	$5,17 \times 10^4$ $\pm 0,51 \times 10^{4a}$	$9,14 \times 10^3$ $\pm 0,12 \times 10^{3a}$	$2,01 \times 10^6$ $\pm 0,53 \times 10^{6d}$	$2,43 \times 10^5$ $\pm 0,29 \times 10^{5ab}$
Đối chứng	$9,55 \times 10^3$ $\pm 0,66 \times 10^{3a}$	$4,97 \times 10^6$ $\pm 0,15 \times 10^{6e}$	$5,29 \times 10^5$ $\pm 0,72 \times 10^{5b}$	$9,45 \times 10^3$ $\pm 0,47 \times 10^{3a}$	$5,03 \times 10^6$ $\pm 0,15 \times 10^{6e}$	$5,27 \times 10^5$ $\pm 0,43 \times 10^{5b}$

Ghi chú: Số liệu trình bày giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn ($n = 3$). Những chữ cái khác nhau trong cùng bảng cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

Bảng 2 cho thấy sự thay đổi mật độ *Vibrio* spp. trên tôm ở các nghiệm thức sau cảm nhiễm. Toàn bộ tôm chưa cảm nhiễm của các nghiệm thức và đối chứng ở cả 2 thí nghiệm đều có mật độ khuẩn rất thấp dao động quanh mức $2,00 \times 10^3$ - $9,77 \times 10^3$ CFU/g ($P > 0,05$). Đây là mức thấp trong khoảng chấp nhận

được trên tôm chân trắng không mắc bệnh AHPND [16]. Ở đối chứng, tôm ở thí nghiệm 1 và 2 đều có lượng *Vibrio* spp. (ban đầu lần lượt là $9,55 \times 10^3$ và $9,45 \times 10^3$ CFU/g) tăng đột biến vào ngày thứ 2 sau cảm nhiễm (lần lượt là $4,97 \times 10^6$ và $5,03 \times 10^6$ CFU/g) ($P < 0,05$) và giảm đáng kể trên tôm còn sống sót sau

15 ngày (lần lượt là $5,29 \times 10^6$ và $5,27 \times 10^5$ CFU/g) ($P < 0,05$). Dữ liệu này là tương đồng với báo cáo về dao động mật độ *Vibrio* spp. trên tôm bệnh ($10^5 - 10^6$ CFU/g) ở vùng Tây Bắc Mexico [16]. Tuy nhiên, số liệu này lại không tương đồng với con số có phần thấp hơn nhiều so với nghiên cứu tương tự ($2,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5$ CFU/g) ở tỉnh Andhra Pradesh (Ấn Độ) [5]. Kết quả khác nhau có thể do sự khác nhau về phương pháp xác định mật độ.

Ở thí nghiệm 1, việc bổ sung cả ba loại thảo dược lâu dài vào chế độ ăn đã giúp kiểm chế mật độ vi khuẩn trên tôm ở mức tương đương ($P > 0,05$) giữa các thời điểm sau cảm nhiễm (ngày 0: $2,00 \times 10^3 - 5,32 \times 10^3$ CFU/g; ngày 2: $1,14 \times 10^5 - 2,61 \times 10^5$ CFU/g; ngày 15: $5,00 \times 10^4 - 5,27 \times 10^4$ CFU/g) so với tôm khỏe mạnh ban đầu. Mật độ vi khuẩn ở ngày 15 của các nghiệm thức thảo dược vẫn thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với đối chứng. Đây là minh chứng cho khả năng kiểm soát *Vibrio* spp. của các loại thảo dược được thí nghiệm.

Ở thí nghiệm 2, việc bổ sung trực tiếp dịch chiết thảo dược vào môi trường nuôi sau cảm nhiễm cũng giúp kiểm chế mật độ vi khuẩn, tuy hiệu quả kém hơn so với ở thí nghiệm 1 ($P < 0,05$). Cụ thể là mật độ *Vibrio* spp. ngày thứ 2 ở các nghiệm thức thảo dược ($1,62 \times 10^6 - 2,16 \times 10^6$ CFU/g) vẫn tăng đáng kể ($P < 0,05$) so với khi chưa cảm nhiễm ($9,14 \times 10^3 - 9,77 \times 10^3$ CFU/g), tuy nhiên vẫn thấp hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với đối chứng ở cùng giai đoạn ($5,03 \times 10^6$ CFU/g). Lượng khuẩn ở ngày 15 không khác biệt ($P > 0,05$) so với đối chứng.

Khả năng giúp tôm chống chịu với *V. parahaemolyticus* có được là do các hoạt tính kháng khuẩn từ các hợp chất có hoạt tính sinh học cao và khả năng kích thích miễn dịch không đặc hiệu của thảo dược [3]. Thảo dược bản địa bao gồm trầu không, rau má và tỏi, chứa nhiều hoạt chất thứ cấp cùng các hợp chất như phytic acid và tannins đều có tiềm năng trong phòng trị bệnh do vi khuẩn gây ra [2]. Cho đến nay, nghiên cứu bổ sung dịch chiết thảo dược trong nâng cao khả năng chống chịu của tôm chân trắng với *V. parahaemolyticus* còn hạn chế, khi mà việc tiến hành và so sánh cùng lúc cả hai hình thức bổ sung vào thức ăn và dùng trực tiếp trong môi trường nuôi cùng thông tin về biến động mật độ khuẩn trong quá trình cảm nhiễm là chưa nhiều. Nghiên cứu của Kong chun và cs (2016) cho thấy, dịch chiết trà xanh khi cho vào nước nuôi sau cảm

nhiễm đã giúp lượng *Vibrio* spp. ($2,3 \times 10^6$ CFU/g) giảm đáng kể ($P < 0,05$) so với đối chứng ($6,4 \times 10^6$ CFU/g) [7], điều này tương đồng với kết quả của thí nghiệm 2. Nghiên cứu khác cho thấy việc phối hợp nhiều loại thảo dược mang lại hiệu quả cộng hưởng tốt hơn trong điều trị vi khuẩn gây bệnh [12], mở ra tiềm năng cho việc phối hợp ba loại thảo dược của nghiên cứu này trong nuôi tôm chân trắng.

4. KẾT LUẬN

Dịch chiết trầu không, rau má và tỏi khi được phối trộn vào thức ăn công nghiệp hoặc bổ sung trực tiếp vào môi trường nuôi đều giúp nâng cao tỷ lệ sống và kiểm chế mật độ *Vibrio* spp. ở tôm chân trắng sau cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*. Trong đó, thảo dược trong chế độ cho ăn lâu dài cho kết quả vượt trội hơn so với bổ sung thảo dược trực tiếp vào môi trường nuôi, mở ra tiềm năng sử dụng thảo dược trong chế độ cho ăn để cải thiện khả năng chống chịu của tôm chân trắng với vi khuẩn gây hại *V. parahaemolyticus*. Nghiên cứu sau này cần tiếp tục thực hiện ở quy mô lớn nhằm khẳng định hiệu quả của các loại thảo dược trong phòng trị bệnh tôm chân trắng. Nghiên cứu cũng cần phân tích thành phần các hợp chất có trong dịch chiết đóng góp trực tiếp vào hiệu quả phòng trị bệnh trên vi khuẩn của các loại thảo dược.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chirawithayaboon, P., Areechon, N., Meunpol., O. (2020). Hepatopancreatic antioxidant enzyme activities and disease resistance of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) fed diet supplemented with garlic (*Allium sativum*) extract. *Agr. Nat. Resour.* 54:377-386.
2. Flores-Miranda, M. C., Luna - González, A., Cortés-Espinosa, D. V., Cortés-Jacinto, E., Fierro - Coronado, J. A., Álvarez-Ruiz, P., González - Ocampo, H. A. & Escamilla - Montes, R. (2014). Bacterial fermentation of *Lemna* sp. as a potential substitute of fish meal in shrimp diets. *African Journal of Microbiology Research.* 8 (14): 1516 - 1526.
3. Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Heo, M. - S. (2011). Influence of diet enriched with green tea on innate humoral and cellular immune response of kelp grouper (*Epinephelus bruneus*) to *Vibrio carchariae* infection. *Fish & Shellfish Immunology.* 30: 972 - 979.

4. Hồng Mộng Huyền, Lê Quốc Việt, Trần Ngọc Hải, Trần Thị Tuyết Hoa (2020). Ảnh hưởng của chất chiết thảo dược lên tăng trưởng, miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng bệnh của tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) với *Vibrio parahaemolyticus*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 56 (5B): 150 - 159.
5. Jayasree, L., Janakiram, P., Madhavi, R. (2006). Characterization of *Vibrio* spp. associated with diseased shrimp from culture ponds of Andhra Pradesh (India). *Journal of the World Aquaculture Society*. 37: 523 - 532.
6. Jha, R. K., Babikian, Y. H., Babikian, H. Y., Le Van Khoa, Wisoyo, D., Srisombat, S., Jiaravanon, B. (2016). Efficacy of natural herbal formulation against acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) causing *Vibrio parahaemolyticus* in *Penaeus vannamei*. *Vet Med Open J.* 2 (1): 1 - 6. doi: 10.17140/VMOJ-1-109.
7. Kongchum, P., Chintonga, S., Chareansaka, N., Subprasert, P. (2016). Effect of Green Tea Extract on *Vibrio parahaemolyticus* Inhibition in Pacific White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Postlarvae. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 11: 117 - 124.
8. Le, P. N. T., Desbois, A. P. (2017). Antibacterial Effect of Eicosapentaenoic Acid against *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus*: Killing Kinetics, Selection for Resistance, and Potential Cellular Target. *Mar. Drugs*. 15, 334. <https://doi.org/10.3390/md15110334>.
9. Lê Nguyễn Thiên Phúc, Nguyễn Minh Thành (2022). Đánh giá ảnh hưởng của các loại thảo dược lên tăng trưởng, tỷ lệ sống và chất lượng thịt của tôm chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*. 8 (2): 73 - 80.
10. H, D. V., Redman C. R., Pantoja B. L., Noble L. M. and Tran, L. (2013). Documentation of an Emerging Disease (Early Mortality Syndrome) in SE Asia and Mexico. OIE Reference Laboratory for Shrimp Diseases, Department of Veterinary Science and Microbiology, School of Animal and Comparative Biomedical Sciences.
11. Lokesh, B., Neeraja, T., Haribabu, P., Ramalingaiah, D., Pamanna, D. (2020). Effect of garlic supplemented diets on growth and survival of Pacific white leg shrimp, *Litopenaeus vannamei* juveniles. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 8 (6): 295 - 299.
12. Más Toro, D., Martínez, Y., Rodríguez, R., Pupo, G., Rosabal, O. & Olmo, C. (2017). Preliminary analysis of secondary metabolites in mixed powders of leaves of medicinal plants. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 22 (1): 1 - 9.
13. Nguyễn Minh Châu, Đào Văn Trí, Phan Thị Thương Huyền, Phạm Đức Hùng (2021). Đánh giá hiệu quả của mô hình nuôi tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) bán thâm canh cải tiến tại Quảng Ngãi. *Tạp chí Khoa học - Công nghệ Thủy sản*. 1: 9 - 18.
14. Nguyễn Thị Hạnh, Phan Thị Vân, Phạm Thị Yến, Lê Thị Mây, Trương Thị Mỹ Hạnh (2021). Khả năng kháng khuẩn và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) của tỏi (*Allum sativum*) lên men. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp*. 63 (2): 49 - 54.
15. Pandey, G., Madhuri, S., Mandloi, A. K. (2012). Medicinal plants useful in fish diseases. *Plant Arch*. 12 (1): 1 - 4.
16. Rodriguez, S. A. S., Gil, B. G., Lozano, R. (2010). Density of Vibrios in Hemolymph and Hepatopancreas of Diseased Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*, from Northwestern Mexico. *Journal Of The World Aquaculture Society*. 41 (S1): 76 - 83.
17. Roque, A., J. F. Turnbull, G. Escalante, B. Gómez Gil, and M. V. Alday Sanz. (1998). Development of a bath challenge for the marine shrimp *Penaeus vannamei* Boone, 1931. *Aquaculture* 169: 283 - 290.
18. Saulnier, D., Haffner, P., Goarant, C., Levy, P., Ansquer, D. (2000). Experimental infection models for shrimp vibriosis studies: A review. *Aquaculture*. 191: 133 - 144. doi: 10.1016/S0044-8486(00)00423-3
19. Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*. 105: 45 - 55.
20. Xie, J., Liu, B., Zhou, Q. L., Su, Y. T., He, Y. J., Pan, L. K., Ge, X. P., Xu, P. (2008). Effects of

Anthraquinone extract from rhubarb *R. officinale* common carp (*Cyprinus carpio* var. Jian).
Bail on the crowding stress response and growth of *Aquaculture*. 281: 5 - 11.

**EFFECTS OF HERBAL EXTRACTS ON THE RESISTANCE OF THE WHITE LEG SHRIMP
(*Litopenaeus vannamei*) JUVENILES TO *Vibrio parahaemolyticus***

Le Nguyen Thien Phuc, Nguyen Minh Thanh

Summary

This study evaluated the effects of three herbal extracts: betel (*Piper betle*), Gotu kola (*Centella asiatica*) and garlic (*Allium sativum*) either incorporating in commercial feed or direct applying in cultured water on the survival and *Vibrio* spp. density of the white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles following the challenge with *Vibrio parahaemolyticus*. In experiment 1, post larvae (PL12) in each tank were prepared by feeding with herbal feed for 30 days. Shrimps were then challenged with *V. parahaemolyticus* and further cultured for 15 days in three respective herbal treatments (betel or Gotu kola or garlic). Each treatment was designed with 3 replicates. Shrimps in the control were fed without herbs. In experiment 2, post larvae (PL12) were fed with commercial feed without herb extracts for 30 days, then challenged with *V. parahaemolyticus*. The experiment 2 was designed with 3 treatments by adding one type of herbal extract to the cultured water of respective treatment after 24 hours challenge. Herbal extracts were added to the culture water for further 15 days, except the control. Shrimps in all tanks of the experiment 2 were fed using commercial feed without herbal extracts. Two experiments improved survival of shrimps and inhibited the harmful *Vibrio* spp. density significantly in comparison with the controls ($P < 0.05$). However, the results from feed mixed with herbal extracts were better than those from the experiment of adding herbal extracts to water ($P < 0.05$). This study demonstrated the potential of using *C. asiatica*, *P. betle* and *A. sativum* extracts incorporated into commercial feed in improving the resistance of white leg shrimp against *V. parahaemolyticus*.

Keywords: *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*, herbs, survival.

Người phản biện: TS. Bùi Quang Tề

Ngày nhận bài: 10/6/2022

Ngày thông qua phản biện: 12/7/2022

Ngày duyệt đăng: 15/7/2022