

ẢNH HƯỞNG CỦA CAO CHIẾT LÁ VỐI BỔ SUNG VÀO THỨC ĂN LÊN ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TỰ NHIÊN CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) CẢM NHIỄM *Vibrio parahaemolyticus*

Trương Thị Hoa^{1*}, Trần Nam Hà¹, Hồ Thị Tùng¹, Trần Quang Khánh Vân¹

¹Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

*Email: truongthihoa@huaf.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành để đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung cao chiết lá vối vào thức ăn đến các chỉ tiêu miễn dịch và tính miễn cảm của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) với bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND). Tôm có khối lượng từ 1,8 - 2,0 g/con được bố trí ngẫu nhiên trong 12 bể nhựa (30 con/bể) với 4 nghiệm thức (NT), mỗi NT lặp lại 3 lần, gồm: NT 1 cho ăn bổ sung cao chiết lá vối 12,5 g/kg, NT 2: 25 g/kg, NT 3: 37,5 g/kg thức ăn và NT đối chứng (ĐC) không bổ sung cao chiết lá vối. Sau 14 ngày, tôm ở các NT được cảm nhiễm *Vibrio parahaemolyticus* TX07-3/3 và tiếp tục theo dõi đến ngày 28. Kết quả xác định tỷ lệ sống của tôm trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* (ngày 14) ghi nhận ở các NT là 100%. Sau 14 ngày cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 (ngày 28) tỷ lệ sống ở NT ĐC là 51,1% thấp hơn ($p < 0,05$) so với các NT thí nghiệm. Số lượng tổng tế bào máu, hoạt tính phenoloxidase và hoạt tính lysozyme trên tôm thẻ chân trắng trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 (ngày 14) ở các NT cho ăn bổ sung cao chiết lá vối cao hơn ($p < 0,05$) NT đối chứng và không có sự khác biệt về số lượng tổng tế bào máu, hoạt tính phenoloxidase và hoạt tính lysozyme ở tôm được cho ăn bổ sung các nồng độ cao chiết khác nhau ($p > 0,05$). Sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3, 14 ngày, có sự khác biệt về các chỉ tiêu tổng tế bào máu, hoạt tính phenoloxidase và hoạt tính lysozyme trên tôm không cho ăn và có cho ăn bổ sung cao chiết lá vối.

Từ khóa: Cao chiết lá vối, miễn dịch, *Vibrio parahaemolyticus*, tôm thẻ chân trắng.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) là một trong những đối tượng nuôi đem lại nguồn lợi nhuận đáng kể và góp phần vào việc phát triển nền kinh tế cho cả nước. Tuy nhiên, hiện nay, nghề nuôi tôm thẻ chân trắng đang đối mặt với rất nhiều thách thức, dịch bệnh và môi trường ô nhiễm. Mặc dù, công nghệ nuôi tôm thẻ chân trắng ngày càng phát triển nhưng sản lượng tôm không tăng mạnh do ảnh hưởng của các đợt dịch bệnh gây chết hàng loạt tôm nuôi [1]. Trong đó, bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (Acute hepatopancreatic necrosis disease - AHPND) được xác nhận do *Vibrio parahaemolyticus* mang

plasmid chứa gen độc tố PirA và PirB (Phototransducing insect-related (Pir)) gây ra, bệnh lây lan nhanh và tôm nhiễm bệnh có tỷ lệ chết cao [2].

Kháng sinh thường được sử dụng để trị bệnh do vi khuẩn gây ra và mang lại hiệu quả tốt trong việc điều trị nhưng thuốc kháng sinh đã được biết đến có nhiều tác dụng không mong muốn như ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường và chất lượng sản phẩm [3, 4]. Do đó, thảo dược được xem là một trong những giải pháp hiệu quả trong việc phòng trị bệnh do vi khuẩn. Trong đó, hoạt tính kháng khuẩn của thảo dược đã được nghiên cứu và ứng dụng trong nuôi trồng thủy sản [5, 6].

Cây vối (*Syzygium nervosum*) phân bố rộng rãi tại các quốc gia nhiệt đới như: Việt Nam, Lào, Campuchia... Đây là loài cây gỗ nhỏ, cao khoảng 5 - 10 m. Trong thành phần của lá vối có chứa khoáng chất, kháng sinh thực vật, các vitamin và tinh dầu [7]. Cao chiết lá vối ngâm chiết bằng ethanol 96% có khả năng kháng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 gây bệnh hoại tử gan tụy cấp trên tôm [8]. Cao chiết thảo dược ghi nhận có hoạt tính kháng khuẩn và tăng cường hệ miễn dịch nên nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định ảnh hưởng của cao chiết lá vối bổ sung vào thức ăn lên đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nguồn lá vối và phương pháp tạo cao chiết: Lá vối tươi được thu từ các hộ dân trồng cây vối tại xã Quảng Thọ, huyện Quảng Điền, thành phố Huế. Lá vối được rửa sạch, sấy khô trong tủ sấy ở nhiệt độ 55°C trong 24 giờ và xay thành bột nguyên liệu bằng máy xay sinh tố đa năng. Bột nguyên liệu được ngâm trong dung môi ethanol 96% với tỉ lệ 1: 10 trong 60 phút. Sau đó, dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman No.1 và làm khô bằng cách sử dụng máy cô quay chân không (Rotavapor R-100, BUCHI, Thụy Sĩ) để loại bỏ dung môi thu được cao chiết lá vối [9]. Cao chiết được bảo quản ở nhiệt độ 4°C để sử dụng cho các thí nghiệm.

Chuẩn bị thức ăn thí nghiệm: Cao chiết lá vối được trộn đều với thức ăn công nghiệp cho tôm (của Công ty Thăng Long - Việt Nam, có thành phần: Độ ẩm < 11%, đạm > 37%, lipid > 4%, xơ < 4%) theo các tỷ lệ 12,5; 25,0; 37,5 g/kg thức ăn. Sau khi thức ăn trộn đều với cao chiết lá vối, được phủ với dầu mực (Vemedim - Việt Nam) với liều lượng 2% và để khô ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Đồng thời, thức ăn không bổ sung cao chiết lá vối cũng được áo ngoài bằng dầu mực. Thức ăn sau khi chuẩn bị được bảo quản ở 4°C để sử dụng trong quá trình thí nghiệm.

Tôm thí nghiệm: Tôm thẻ chân trắng có khối lượng từ 1,8 - 2,0 g/con được cung cấp từ trại giống Phan Toàn, xã Phú Thuận, huyện Phú Vang, thành

phố Huế. Tôm được nuôi thuần trong bể nhựa 1 m³, ở độ mặn 22 - 25‰ trong 30 ngày trước khi thí nghiệm. Tôm được xác định không nhiễm bệnh đốm trắng (white spot disease (WSD)) và vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 bằng kỹ thuật Polymerase chain reaction (PCR) tại Trạm chẩn đoán xét nghiệm và điều trị bệnh động vật của Chi cục Chăn nuôi và Thú y thành phố Huế.

Vi khuẩn thí nghiệm: Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 được lấy từ bộ sưu tập vi khuẩn của Bộ môn Bệnh thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế. Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 chứa các gen độc tố PirA và PirB được phân lập trên tôm thẻ chân trắng nuôi tại thành phố Huế bị bệnh hoại tử gan tụy cấp [10]. Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 được nuôi trên môi trường Tryptone Soya Agar (TSA, Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 2% NaCl ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Sau đó, lấy khuẩn lạc vi khuẩn chuyển sang nuôi cấy trên môi trường Tryptic Soy Broth (TSB, Himedia, Ấn Độ) có bổ sung 2% NaCl ở nhiệt độ 28°C trong 24 giờ. Mật độ vi khuẩn được xác định theo phương pháp đo mật độ quang học (Optical density - OD) ở bước sóng 600 nm trên máy quang phổ UV-VIS (U2900, Hitachi, Nhật Bản) ở giá trị OD = 1 (tương đương mật độ vi khuẩn là 10⁹ CFU/mL, giá trị tính được đếm trực tiếp từ khuẩn lạc khi xây dựng đường chuẩn cho chủng *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 tại Phòng thí nghiệm Bệnh Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế, sau đó mật độ vi khuẩn được pha loãng về 10⁵ CFU/mL để sử dụng trong các thí nghiệm.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp bố trí và theo dõi thí nghiệm

Tôm có khối lượng từ 1,8 - 2,0 g/con được được bố trí ngẫu nhiên trong 12 bể nhựa (30 con/bể). Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 4 nghiệm thức (NT), mỗi NT lặp lại 3 lần, bao gồm: NT cho tôm ăn thức ăn không bổ sung cao chiết lá vối (ĐC); NT cho tôm ăn thức ăn bổ sung cao chiết lá vối với nồng độ 12,5 g/kg thức ăn (NT 1); NT cho tôm ăn thức ăn bổ

sung cao chiết lá với nồng độ 25,0 g/kg thức ăn (NT 2); NT cho tôm ăn thức ăn bổ sung cao chiết lá với nồng độ 37,5 g/kg thức ăn (NT 3). Tôm được cho ăn 4 lần/ngày (7, 11, 14 và 18 giờ), với lượng 3% khối lượng cơ thể. Vào ngày thứ 14 của thí nghiệm, tôm ở các NT được cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 bằng phương pháp ngâm trong 30 L nước biển có độ mặn 22‰ chứa vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 với mật độ 10^5 CFU/mL trong 1 giờ [11]. Mật độ vi khuẩn cảm nhiễm là 10^5 CFU/mL là giá trị LD50 của *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 trên tôm thẻ chân trắng [10]. Tiếp tục theo dõi và cho tôm ăn chế độ thí nghiệm cho đến ngày 28. Tỷ lệ chết tích lũy của tôm được theo dõi trong 28 ngày thí nghiệm. Vào ngày 1, 14 và 28 của thí nghiệm, 3 con tôm trong mỗi bể được thu để lấy mẫu máu nhằm xác định các chỉ tiêu miễn dịch (tổng tế bào máu (total haemocyte count - THC), hoạt tính phenoloxidase (PO) và hoạt tính lysozyme).

Các yếu tố môi trường: Nhiệt độ 25 - 28°C, độ mặn 22 - 25‰, oxy hòa tan 5,5 - 6 mg/L, pH 7,9 - 8,1 được duy trì trong suốt thời gian thí nghiệm.

2.2.2. Phương pháp xác định tỷ lệ chết tích lũy

Theo dõi thí nghiệm, xác định dấu hiệu bệnh lý và số lượng tôm chết hằng ngày cho đến 28 ngày thí nghiệm. Số tôm thu mẫu phân tích các chỉ tiêu miễn dịch không tính vào tỷ lệ tôm chết tích lũy. Số lượng tôm chết được theo dõi hằng ngày, tỷ lệ sống của tôm ở từng nghiệm thức được xác định theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ sống (\%)} = \frac{\text{Số tôm sống}}{\text{Tổng số tôm thí nghiệm}} \times 100$$

2.2.3. Phương pháp thu mẫu máu và xác định tổng tế bào máu

Tổng tế bào máu (THC) được xác định theo phương pháp của Le Moullac và cs (1997) [12]. 100 μ L máu tôm được lấy từ gốc chân bò thứ 3 của tôm bằng kim tiêm vô trùng có chứa 900 μ L dung dịch chống đông (30 mM trisodium citrate, 0,34 M sodium chloride, 10 mM EDTA, 0,12 M glucose, pH 7,55). Số lượng tế bào máu được đếm bằng buồng đếm hồng cầu (lặp lại 3 lần), quan sát dưới kính hiển vi (40X) và tính bằng công thức: THC =

$C \times 10 \times 5 \times 10$ (tb/mm³); (C: Tổng số tế bào trong 5 vùng đếm).

2.2.4. Phương pháp xác định hoạt tính phenoloxidase

Hoạt tính của phenoloxidase (PO) được xác định theo phương pháp của Hernández-López và cs (1996) [13]. Hoạt tính phenoloxidase được đo bằng phương pháp đo quang phổ bằng cách ghi lại sự hình thành của dopachrome được sản xuất từ L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). Lấy 100 μ L máu tôm (máu được lấy từ gốc chân bò thứ 3 của tôm bằng kim tiêm vô trùng) pha loãng trong 900 μ L dung dịch chống đông. Tiến hành ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong 20 phút ở nhiệt độ 4°C. Sau khi ly tâm, loại bỏ phần dịch phía trên, phần tế bào máu được hòa tan trong 500 μ L dung dịch đệm cacodylate citrate (10 mM sodium cacodylate, 450 mM sodium chloride và 100 mM trisodium citrate; pH 7,0), tiếp tục ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút, 20 phút ở 4°C. Loại bỏ phần dịch nổi phía trên, phần tế bào máu được hòa tan trong 100 μ L dung dịch đệm cacodylate (10 mM sodium cacodylate, 450 mM sodium chloride, 10 mM calcium chloride và 260 mM magnesium chloride, pH 7,0) và chia ra 2 ống. Một ống được dùng để đo hoạt tính PO, ống còn lại làm đối chứng. Lấy 100 μ L dung dịch ở ống sử dụng để đo PO trộn với 100 μ L trypsin 0,1% và ủ trong 10 phút ở 25°C. Sau đó, cho thêm 50 μ L L-DOPA (3 mg/mL) và ủ trong 5 phút ở 25°C, tiếp theo bổ sung 800 μ L dung dịch đệm cacodylate. Ống đối chứng: Lấy 100 μ L dung dịch trộn với 100 μ L dung dịch đệm cacodylate (thay thế trypsin), sau đó cho thêm 50 μ L L-DOPA (3 mg/mL) và ủ trong 5 phút ở 25°C, tiếp theo bổ sung 800 μ L dung dịch đệm cacodylate. Hoạt tính phenoloxidase được xác định bằng máy so màu quang phổ tại bước sóng 490 nm.

2.2.5. Phương pháp xác định hoạt tính lysozyme

Hoạt tính lysozyme (Lysozyme activity - LYS) được định lượng theo quy trình được mô tả bởi Chiu và cs (2007) [14]. Lấy 500 μ L dung dịch máu tôm (gồm: 100 μ L máu tôm và 900 μ L dung dịch chống đông) được ly tâm ở tốc độ 6.500 vòng/phút trong 2 phút. Loại bỏ phần dịch nổi, phần lắng ở

dưới được trộn với 1 mL (0,02%) dung dịch *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, St. Louis, MO, Hoa Kỳ). Phản ứng được thực hiện ở nhiệt độ phòng và độ hấp thụ ở bước sóng 530 nm được đo sau 0,5 và 4,5 phút. Một đơn vị hoạt động của LYS được định nghĩa là lượng enzyme tạo ra giảm độ hấp thụ là 0,01/phút và hoạt động đặc hiệu được biểu thị bằng U/mg protein.

2.2.6. Phương pháp xử lý số liệu

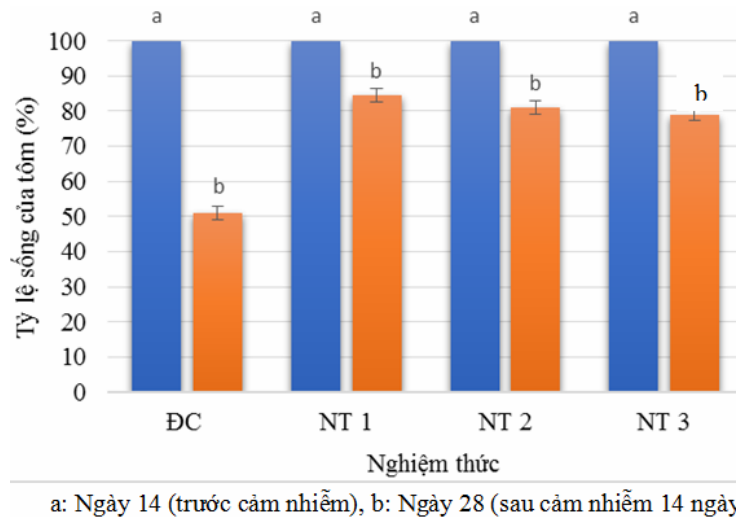
Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2013 và SPSS 20. Phân tích phương sai ANOVA một yếu tố để so sánh sự khác nhau về tổng tế bào máu, hoạt tính phenoloxidase và hoạt tính

lysozyme ở mức ý nghĩa 0,05% bằng phương pháp kiểm định LSD (Least Significant Difference Test).

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

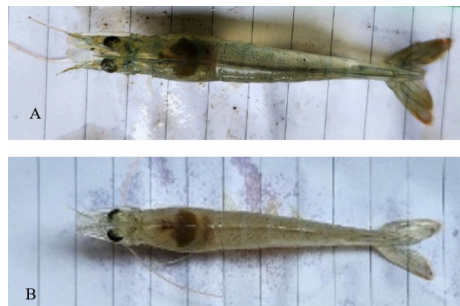
3.1. Tỷ lệ sống của tôm

Kết quả xác định tỷ lệ sống của tôm trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 (ngày 14) ghi nhận ở các nghiệm thức là 100%. Sau 14 ngày cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 (ngày 28) tỷ lệ sống ở NTĐC là 51,1% thấp hơn ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức thí nghiệm. Tỷ lệ sống của tôm ở các NT 1, NT 2 và NT 3 lần lượt là 84,4; 81,1 và 78,9% (Hình 1).



Hình 1. Tỷ lệ sống của tôm ở các nghiệm thức

Ghi chú: Các giá trị ở các NT có ký hiệu a, b khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).



Hình 2. Tôm thẻ chân trắng thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Ghi chú: A - Tôm không bị bệnh, gan tụy tôm có màu nâu đen, ruột đầy thức ăn; B - Tôm bị bệnh khi cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, gan tụy màu vàng, ruột có ít thức ăn và đứt quãng, vỏ mềm.

Kết quả thu mẫu tôm kiểm tra dấu hiệu bệnh ruột có ít thức ăn và đứt quãng, vỏ mềm. Tôm lý cho thấy, tôm bệnh có khối gan tụy màu vàng, không bị bệnh, gan tụy tôm có màu nâu đen, ruột

đầy thức ăn (Hình 2). Tôm thẻ chân trắng ở các NT cảm nhiễm thể hiện dấu hiệu bệnh lý được tái phân lập lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 bằng cách lấy mẫu ở gan tụy và cấy trên môi trường TCBS, định danh bằng bộ kit API 20E và xác định các chủng vi khuẩn phân lập được là *V. parahaemolyticus* TX07-3/3. Dựa vào dấu hiệu bệnh lý đặc trưng trên tôm bị bệnh do AHPND và kết quả phân lập vi khuẩn xác định tôm ở các NT cảm nhiễm chết do vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3.

3.2. Tổng tế bào máu

Số lượng tổng tế bào máu trung bình trên tôm thẻ chân trắng ở ngày đầu thí nghiệm (trước khi bắt đầu cho ăn thức ăn có bổ sung cao chiết lá vối) là $157,64 \times 10^2$ tb/mm³. Đến ngày 14 (trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3) số lượng tổng tế bào máu tôm ở các NT cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết lá vối cao hơn ($p < 0,05$) so

với nhóm đối chứng. Ở các NT cho ăn thức ăn có bổ sung cao chiết lá vối có số lượng tổng tế bào máu trung bình lần lượt ở NT 1, NT 2 và NT 3 là $179,44 \times 10^2$ tb/mm³; $178,89 \times 10^2$ tb/mm³; $176,67 \times 10^2$ tb/mm³ và không có sự khác biệt về số lượng tổng tế bào máu ở tôm được cho ăn thức ăn thí nghiệm ($p > 0,05$). Nhìn chung, tổng số tế bào máu tôm ở các NT có xu hướng tăng lên theo thời gian nuôi và đặc biệt tăng nhanh ở nhóm tôm cho ăn thức ăn thí nghiệm. Sau khi cảm nhiễm vi khuẩn 14 ngày, ở NTĐC tổng tế bào máu thấp hơn ($p < 0,05$) so với các NT thí nghiệm. Ở các thí nghiệm thức cho ăn thức ăn có bổ sung cao chiết lá vối và cảm nhiễm vi khuẩn có số lượng tổng tế bào máu trung bình lần lượt ở NT 1, NT 2 và NT 3 là $195,56 \times 10^2$ tb/mm³, $187,22 \times 10^2$ tb/mm³ và $185,56 \times 10^2$ tb/mm³ và không có sự khác biệt về số lượng tổng tế bào máu ở tôm được cho ăn thức ăn thí nghiệm ($p > 0,05$) (Bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của thức ăn bổ sung cao chiết lá vối và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 lên tổng tế bào máu của tôm thẻ chân trắng

Thí nghiệm	Tổng tế bào máu ($\times 10^2$ tb/mm ³)		
	Ngày 01 (trước khi bắt đầu cho ăn bổ sung cao chiết)	Ngày 14 (trước khi cảm nhiễm)	Ngày 28 (sau cảm nhiễm 14 ngày)
ĐC	157,64 ± 7,59	160,56 ± 6,35 ^{aA}	170,56 ± 5,83 ^{aA}
NT 1		179,44 ± 3,00 ^{bB}	195,56 ± 3,91 ^{bB}
NT 2		178,89 ± 4,17 ^{bB}	187,22 ± 4,41 ^{bB}
NT 3		176,67 ± 4,33 ^{bB}	185,56 ± 4,64 ^{bB}

Ghi chú: Giá trị được trình bày là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một hàng có ký hiệu a, b khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Các giá trị trên cùng một cột có ký hiệu A, B khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Các tế bào máu có vai trò trong việc nhận biết vật thể lạ xâm nhập vào cơ thể, khả năng thực bào, quá trình melanin hoá, quá trình gây độc và giao tiếp tế bào. Khi giáp xác đáp ứng với sự cảm nhiễm của tác nhân gây bệnh có thể làm mất số lượng lớn các tế bào máu trong hệ thống tuần hoàn, các tế bào máu sau đó được phục hồi thông qua quá trình

tổng hợp nhanh chóng và giải phóng các tế bào máu mới bởi mô tạo máu của giáp xác. Tế bào máu của giáp xác giữ vai trò quan trọng trong hệ thống miễn dịch, thực hiện chức năng thực bào, đóng gói, lưu trữ và phóng thích pro-phenoloxidase chống lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh AHPND trên tôm [15, 16].

3.3. Hoạt tính phenoloxidase

Hoạt tính phenoloxidase trong máu tôm thẻ chân trắng ở các NT ngày đầu thí nghiệm (chưa cho ăn thức ăn có trộn cao chiết) ở các NT là $0,161 \pm 0,005$. Ở thời điểm 14 ngày (trước khi gây cảm nhiễm), hoạt tính phenoloxidase trong máu tôm thẻ chân trắng ở NT 1, NT 2 và NT 3 cao hơn ($p < 0,05$) so với NTĐC. Kết quả cho thấy, hoạt tính

phenoloxidase ở các NT cho ăn bổ sung cao chiết lá vối cao hơn ($p < 0,05$) so với NT cho ăn không bổ sung cao chiết lá vối. Hoạt tính phenoloxidase sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 14 ngày, ở NT đối chứng thấp hơn so với trước khi cảm nhiễm ($p < 0,05$), ở các NT thí nghiệm không có sự sai khác về hoạt tính phenoloxidase trước và sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* (Bảng 2).

Bảng 2. Ảnh hưởng của chế độ cho ăn bổ sung cao chiết lá vối và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 lên hoạt tính phenoloxidase của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức

Nghiệm thức	Hoạt tính của phenoloxidase (OD, 490 nm)		
	Ngày 01 (trước khi bắt đầu cho ăn bổ sung cao chiết)	Ngày 14 (trước khi cảm nhiễm)	Ngày 28 (sau cảm nhiễm 14 ngày)
ĐC	$0,161 \pm 0,005$	$0,216 \pm 0,005^{aA}$	$0,202 \pm 0,004^{bA}$
NT 1		$0,242 \pm 0,004^{aB}$	$0,243 \pm 0,005^{aB}$
NT 2		$0,236 \pm 0,005^{aB}$	$0,238 \pm 0,004^{aB}$
NT 3		$0,232 \pm 0,004^{aB}$	$0,236 \pm 0,005^{aB}$

Ghi chú: Giá trị được trình bày là giá trị trung bình $\pm$ độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một hàng có ký hiệu a, b khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Các giá trị trên cùng một cột có ký hiệu A, B khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

Hoạt tính phenoloxidase là một thành phần quan trọng trong hệ thống miễn dịch dịch thể của giáp xác, giúp nhận dạng vật thể lạ. Hệ thống này được kích hoạt khi được tác động bởi các thành phần của vách tế bào vi khuẩn, chẳng hạn như: Peptidoglican, β -1,3-glucan, lipopolysaccharide và dẫn đến proPO chuyển thành PO [17]. PO được lưu trữ và kích trong tế bào có hạt (granular cells) và tế bào bán hạt (semi-granular cells) trong máu tôm. Theo Wang và Chen (2005) [18], hoạt tính phenoloxidase ở tôm thường tăng lên khi có sự tăng lên của tổng tế bào máu. Như vậy, việc bổ sung chất chiết thảo dược vào thức ăn giúp gia tăng hoạt tính PO trong máu tôm và tăng cường hệ miễn dịch của tôm thẻ chân trắng. Theo Reverter và cs (2017) [19], tác dụng của cao chiết thảo dược đến phản ứng miễn dịch, tăng cường bảo vệ vật chủ chống lại tác nhân gây bệnh phụ thuộc vào liều lượng và thời gian mà vật chủ tiếp xúc với chất

chiết thảo dược. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, việc bổ sung cao chiết lá vối vào thức ăn với liều lượng 12,5 - 37,5 g/kg thức ăn giúp tăng hoạt tính PO tăng cường cơ chế đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng.

3.4. Hoạt tính lysozyme

Kết quả xác định ảnh hưởng của chế độ cho ăn bổ sung cao chiết lá vối lên hoạt tính lysozyme của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức cho thấy, hoạt tính lysozyme trong máu tôm thẻ chân trắng ở ngày đầu thí nghiệm (chưa cho ăn thức ăn có trộn cao chiết) là 0,668 U/mg protein. Ở thời điểm 14 thí nghiệm, hoạt tính phenoloxidase trong máu tôm thẻ chân trắng ở NT 2, NT 3 và NT 4 cao hơn NT 1 ($p < 0,05$). Hoạt tính của lysozyme sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3, 14 ngày, ở các NT cao hơn so với trước khi cảm nhiễm ($p < 0,05$), ở các NTĐC không có sự sai khác về hoạt tính lysozyme trước và sau khi cảm

nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3, trong khi đó (p < 0,05) trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 (Bảng 3).

Bảng 3. Ảnh hưởng của thức ăn bổ sung cao chiết lá vối và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 lên hoạt tính lysozyme của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức

Nghiệm thức	Hoạt tính lysozyme (U/mg protein)		
	Ngày 01 (trước khi bắt đầu cho ăn bổ sung cao chiết)	Ngày 14 (trước khi cảm nhiễm)	Ngày 28 (sau cảm nhiễm 14 ngày)
ĐC	0,668 ± 0,019	0,712 ± 0,025 ^{aA}	0,756 ± 0,034 ^{aA}
NT 1		0,747 ± 0,010 ^{aB}	0,856 ± 0,046 ^{bB}
NT 2		0,746 ± 0,005 ^{aB}	0,808 ± 0,025 ^{bB}
NT 3		0,742 ± 0,012 ^{aB}	0,794 ± 0,005 ^{bB}

Ghi chú: Giá trị được trình bày là giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một hàng có ký hiệu a, b khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05). Các giá trị trên cùng một cột có ký hiệu A, B khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p < 0,05).

Kết quả cho thấy, hoạt tính lysozyme ở các NT cho ăn bổ sung cao chiết lá vối cao hơn NT cho ăn không bổ sung cao chiết lá vối (p < 0,05). Không có sự khác biệt về hoạt tính lysozyme giữa các NT có bổ sung cao chiết lá vối. Việc gia tăng hoạt tính lysozyme của tôm thẻ chân trắng giúp tôm kháng tốt hơn với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 [20].

Lysozyme là một trong những chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu có vai trò chống lại tác nhân gây bệnh, được hình thành bởi quá trình thủy phân liên kết glycosic của vách tế bào vi khuẩn [21]. Ngoài ra, lysozyme còn có hoạt tính ly giải các loài vi khuẩn Gram (+) và Gram (-), trong đó có một số loài thuộc giống vi khuẩn *Vibrio* gây bệnh trên tôm he [22]. Do đó, khi bổ sung cao chiết lá vối vào thức ăn cho tôm đã làm tăng hoạt tính lysozyme, từ đó giúp tăng cường đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng chống lại vi khuẩn gây bệnh.

4. KẾT LUẬN

Kết quả xác định tỷ lệ sống của tôm trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 (ngày 14) ghi nhận ở các NT là 100%. Sau 14 ngày cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* (ngày 28) tỷ lệ sống ở NTĐC là 51,1% thấp hơn (p < 0,05) so với các NT cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết lá vối.

Số lượng tổng tế bào máu, hoạt tính phenoloxidase và hoạt tính lysozyme trên tôm thẻ chân trắng trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3 (ngày 14) ở các NT cho ăn bổ sung cao chiết lá vối cao hơn (p < 0,05) NTĐC và không có sự khác biệt về số lượng tổng tế bào máu, hoạt tính phenoloxidase và hoạt tính lysozyme ở tôm được cho ăn bổ sung các nồng độ cao chiết khác nhau (p > 0,05).

Sau khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3, 14 ngày, tổng tế bào máu NTĐC thấp hơn (p < 0,05) các nghiệm thức thí nghiệm và không có sự khác biệt về số lượng tổng tế bào máu ở tôm được cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết (p > 0,05). Hoạt tính phenoloxidase ở NTĐC thấp hơn so với trước khi cảm nhiễm (p < 0,05), ở các NT thí nghiệm không có sự sai khác về hoạt tính phenoloxidase trước và sau cảm nhiễm. Hoạt tính lysozyme ở các NT cho ăn thức ăn bổ sung cao chiết lá vối cao hơn (p < 0,05) so với trước khi cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* TX07-3/3.

LỜI CẢM ƠN

*Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của đề tài cấp Đại học Huế: “Ảnh hưởng của cao chiết lá vối (*Syzygium nervosum*) lên tăng trưởng, miễn dịch và khả năng kháng bệnh của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus**

vannamei) với vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus*". Mã số đề tài DHH2023-02-168.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Flegel, T. W. (2019). A future vision for disease control in shrimp aquaculture. *The Journal of the World Aquaculture Society*, pp. 1 - 18.
2. OIE - World Organisation for Animal Health (2019). *Acute hepatopancreatic necrosis disease*. Retrieved May 25, 2021, from <https://www.oie.int/en/home>.
3. Jayaprakas, V. and Sambhu, C. (1996). Growth response of white prawn, *Penaeus indicus*, to dietary L-carnitine. *Asian Fisheries Science*, 9, 209 - 220.
4. Sarter, S., Kha, N. H. N., Hung, L. T., Lazard, J. and Didier, Montet (2007). Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*, 18(11), 1391 - 1396.
5. Castro, R., Lamas, J., Morais, P., Sanmartín, M. L., Orallo, F. and Leiro, J. (2008). Resveratrol modulates innate and inflammatory responses in fish leucocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 126(1 - 2), 9 - 19.
6. Citarasu, T., Venkatramalingam, K., Micheal Babu, M., Raja Jeya Sekar, R. & Petermarian, M. (2003). Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea corylifolia* on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae. *Aquaculture International*, 11, 581 - 595.
7. Giang, N. P., Tu, T. T. N. and Hieu, N. N. (2020). *Ethnopharmacology, Phytochemistry and Pharmacology of Syzygium nervosum*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.
8. Hoa, T. T., Van, T. Q. K., Tung H. T., Tuan, D. Q., Ha, T. N. (2023). Antibacterial activity of *Syzygium nervosum* extracts against *Vibrio parahaemolyticus*, causing acute hepatopancreatic necrosis in white leg shrimps (*Litopenaeus vannamei*). *Hue University Journal of Science: Agriculture and Rural Development*, 132(3D), 189 - 200.
9. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007). *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*. Nxb Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.
10. Quang, H. T., Lan, T. T., Hai, T. T. H., Yen, P. T. H., Van, T. Q. K., Tung, H. T., Binh, M. N., Son, N. K. H., Linh, N. Q., Tram, N. D. Q. (2020). Genetic diversity and toxic genes analysis of *Vibrio* spp. isolated from white leg shrimp and marine fishes cultured in Tam Giang lagoon in Thua Thien Hue province, Vietnam. *Indian Journal of Science and Technology*, 13(13), 1412 - 1422.
11. Loc, T., Nunan, L., Redman, R. M., Mohney, L. L., Fitzsimmons, K., and 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(1), 45 - 55.
12. Le Moullac, G., Klein B., Sellos, D., and Van Wormhoudt, A. (1997). Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 208(1 - 2), 107 - 125.
13. Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., and Vargas-Albores F. (1996). Activation of the phenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 113(1), 61 - 66.
14. Chiu, C. H., Guu, Y. K., Liu, C. H., Pan, T. M. and Cheng, W. (2007). Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immunology*, 23, 364 - 377.
15. Kulkarni, A., Krishnan, S., Anand, D., Kokkattunivarthil Uthaman, S., Otta, S. K., Karunasagar, I. and Kooloth Valappil, R. (2021). Immune responses and immunoprotection in crustaceans with special reference to shrimp. *Reviews in Aquaculture*, 13(1), 431 - 459.
16. Luangtrakul, W., Boonchuen, P., Jaree, P., Kumar, R., Wang, H. C., and Somboonwiwat, K. (2021). Cytotoxicity of *Vibrio parahaemolyticus* AHPND toxin on shrimp hemocytes, a newly

identified target tissue, involves binding of toxin to aminopeptidase N1 receptor. *PLoS pathogens*, 17(3), 1 - 21.

17. Ashida, M. and Amasaki H.T. (1990). Biochemistry of the phenoloxidase system in insects: with special reference to its activation. In: Oh&hi, E., Ishizaki, H. (Eds.). Molting and Metamorphosis. Springer, Berlin, 239 - 265

18. Wang, L. U. and Chen, J. C. (2005). The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* at different salinity levels. *Fish and Shellfish Immunology*, 18(4), 269 - 278.

19. Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sasal, P. and Saulnier, D. (2017). Use of medicinal plants in aquaculture. In: Austin B. and Newaj-

Fyzul A. Ed., Diagnosis and Control of Disease of Fish and Shellfish, 223 - 261.

20. Hong, N. T. X., Linh, N. T. H., Baruah, K., Thuy, D. T. B. and Phuoc, N. N. (2022). The combined use of *Pediococcus pentosaceus* and fructooligosaccharide improves growth performance, immune response and resistance of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* Against *Vibrio parahaemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 13, 826151.

21. Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R. and Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: A review. *Veterinary Medicine* (Praha), 56, 486 - 503.

22. Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*, 20, 137 - 151.

EVALUATION OF *Syzygium nervosum* EXTRACT-SUPPLEMENTED DIET ON IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN WHITELEG SHRIMP (*Litopenaeus vannamei*) CHALLENGED WITH *Vibrio parahaemolyticus*

Truong Thi Hoa¹, Tran Nam Ha¹, Ho Thi Tung¹, Tran Quang Khanh Van¹

¹University of Agriculture and Forestry, Hue University

Summary

The study was conducted to evaluate the effect of supplementing diets with *Syzygium nervosum* leaf extract on the immune parameters and susceptibility of whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to Acute Hepatopancreatic Necrosis Disease (AHPND). Shrimp weighing 1.8 - 2.0 grams each were randomly allocated into 12 plastic tanks (30 shrimp/tank) with four treatments (NT), each treatment replicated three times. The treatments included: NT1 (12.5 g/kg of feed), NT2 (25 g/kg of feed), NT3 (37.5 g/kg of feed) and a control group (NTC) without the extract supplementation. After 14 days, shrimp in the treatment groups were challenged with *Vibrio parahaemolyticus* and monitored for an additional 14 days. The survival rate of shrimp before infection (day 14) was 100% across all treatments. After 14 days post-infection (day 28), the survival rate in the control group was 51.1%, significantly lower ($p < 0.05$) compared to the treatment groups. Total hemocyte count (THC), phenoloxidase activity and lysozyme activity in shrimp before infection (day 14) were significantly higher ($p < 0.05$) in the extract-supplemented groups compared to the control group, with no significant differences observed among the different extract concentrations ($p > 0.05$). After 14 days post-infection, significant differences were observed in THC, phenoloxidase activity and lysozyme activity between the control and extract-supplemented groups.

Keywords: *Syzygium nervosum*, extract, immunity, *Vibrio parahaemolyticus*, whiteleg shrimp.

Ngày nhận bài: 8/01/2025

Ngày chuyển phản biện: 10/02/2025

Ngày thông qua phản biện: 25/02/2025

Ngày duyệt đăng: 10/3/2025