



DOI:10.22144/ctu.jvn.2019.110

## ẢNH HƯỞNG CỦA CAO CHIẾT THẦU DẦU (*Ricinus communis* L.) LÊN MIỄN DỊCH VÀ KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH DO *Vibrio parahaemolyticus* CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Penaeus vannamei*)

Hồng Mộng Huyền<sup>1\*</sup>, Võ Tấn Huy<sup>2</sup> và Trần Thị Tuyết Hoa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup>Học viên ngành Nuôi trồng Thủy sản K23, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Hồng Mộng Huyền (email: hmhuyen@ctu.edu.vn)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 14/12/2018

Ngày nhận bài sửa: 21/02/2019

Ngày duyệt đăng: 30/08/2019

### Title:

Effects of *Ricinus communis* L. extract on the immune response and resistance to *Vibrio parahaemolyticus* of the white leg shrimp (*Penaeus vannamei*)

### Từ khóa:

Cao chiết thầu dầu, chiết xuất thảo dược, đáp ứng miễn dịch, tôm thẻ chân trắng, *V. parahaemolyticus*

### Keywords:

Herbal extract, immune response, *Ricinus communis* L. extract, *V. parahaemolyticus*, white leg shrimp

### ABSTRACT

This study aim to determine effects of *R. communis* L. extract on the immune response and resistance to *V. parahaemolyticus* of the white leg shrimp (*P. vannamei*). The shrimp was reared with commercial feed mixed with 0; 0.5%; 1% and 2% *R. communis* extract for 60 days. The total haemocyte count (THC), the differential haemocyte count (DHC), phenoloxidase (PO) activity and superoxide dismutase (SOD) activity of the supplemented experiment at 30-day and 60-day treatment. The resistance to *V. parahaemolyticus* of *P. vannamei* were examine somebody in the 60 day treatment. The results showed that (i) THC, DHC and PO activity in the supplemented treatments were higher than in the control treatment in the 30th day and 60th day; however, the supplemented treatment of 1.0% was the highest ( $P < 0.05$ ); (ii) The THC, DHC, PO increased in the supplementation of *R. communis* L. extract after being challenged with *V. parahaemolyticus*. The survival rate at 14 days post-infection was much higher in the treatment of 1.0% of *R. communis* L. extract (73.33%) than in the control treatment (33.33%) ( $p < 0.05$ ).

### TÓM TẮT

Thí nghiệm nhằm đánh giá tác động của cao chiết thầu dầu (*R. communis* L.) lên đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng *V. parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng (*P. vannamei*). Tôm được cho ăn thức ăn trộn với cao chiết thầu dầu 0; 0,5; 1; 1,5% trong 60 ngày. Chỉ số huyết học, hoạt tính phenoloxidase (PO), superoxide dismutase (SOD) được xác định vào ngày 30, 60. Khả năng đề kháng với *V. parahaemolyticus* của tôm thẻ chân trắng vào ngày 60. Kết quả (i) chỉ tiêu THC, DHC và PO ở tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung cao chiết thầu dầu cao hơn so với đối chứng ở 30 và 60 ngày, nghiệm thức bổ sung 1,0% khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức khác; (ii) chỉ tiêu THC, LGC, HC, PO được tăng cường ở các nghiệm thức bổ sung sau khi cảm nhiễm. Tỷ lệ sống sau 14 ngày cảm nhiễm ở nghiệm thức bổ sung 1,0% cao chiết thầu dầu (73,33%) cao hơn so với đối chứng (33,33%) ( $p < 0,05$ ).

Trích dẫn: Hồng Mộng Huyền, Võ Tấn Huy và Trần Thị Tuyết Hoa, 2019. Ảnh hưởng của cao chiết thầu dầu (*Ricinus communis* L.) lên miễn dịch và khả năng kháng bệnh do *Vibrio parahaemolyticus* của tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(4B): 72-80.

## 1 GIỚI THIỆU

Trong hệ miễn dịch của tôm chỉ diễn ra quá trình đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, do ở tôm thiếu những yếu tố hình thành nên quá trình đáp ứng miễn dịch đặc hiệu như tế bào lympho T, phân tử major histocompatibility complex (MHC) và immunoglobulin (Ig). Trong đó quá trình đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của tôm được thực hiện nhờ vào hệ thống miễn dịch dịch thể và miễn dịch tế bào, cả hai hoạt động cùng với nhau, giúp cho sự đào thải các vật thể lạ gây hại đến vật chủ (Hoess *et al.*, 1999; Iwanaga and Lee, 2005). Cơ chế miễn dịch tế bào bao gồm tất cả các hoạt động được thực hiện chủ yếu nhờ vào các tế bào máu, tham gia cũng như kích thích động thực bào, tạo thể bao, thể hạch bao vây và phá hủy các vật thể lạ thông qua hệ thống hoạt hóa Pro-phenoloxidase (proPO), hình thành cơ chế chống oxy hóa, phá hủy các ion tự do bởi cơ chế chống oxy hóa, một số chất chống oxy hóa như enzyme catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), ascorbate,  $\beta$ -carotene, flavonoid,  $\alpha$ -tocopherol (Campa-Córdova *et al.*, 2002). Mặt khác, miễn dịch dịch thể bao gồm các hệ thống bổ thể, đông máu, yếu tố kết dính tế bào và quá trình tổng hợp các loại peptide kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus. Ngoài ra, vỏ kitin ở tôm là rào cản vật lý có vai trò trong các quá trình sinh lý khác nhau liên quan đến các phản ứng miễn dịch (Holmblad and Söderhäll, 1999; Jiravanichpaisal *et al.*, 2006). Đã có nhiều nghiên cứu chất chiết xuất từ thực vật có khả năng kháng khuẩn, kháng virus, ký sinh trùng, nấm, kích thích tăng trưởng, kích thích miễn dịch, tăng cường khả năng kháng lại mầm bệnh. Cụ thể như chiết xuất từ lu lu đực (*Solanum nigrum*) giúp tôm sú (*Penaeus monodon*) tăng cường miễn dịch (Harikrishnan *et al.*, 2011), hay một nghiên cứu về sự kết hợp giữa vitamin C và thảo dược Trung Quốc cũng giúp tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) tăng cường miễn dịch chống lại vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (Qiao *et al.*, 2011). Báo cáo về năm loại thảo dược như tai tượng Ấn (*Acalypha indica*), cây đĩnh lịch (*Hygrophila spinosa*), hồ hoàng liên (*Picrorhiza kurroa*), dây thần thông (*Tinospora cordifolia*) và gừng (*Zingiber officinale*) giúp gia tăng số lượng tế bào máu (THC), hoạt động thực bào, phenol oxidase (PO), hoạt động haemagglutinin và hoạt tính làm sạch vi khuẩn trên tôm he Ấn Độ (*Fenneropenaeus indicus*), chống lại tác nhân gây bệnh *Vibrio harveyi* (Rajeswari *et al.*, 2012).

Cây thầu dầu (*Ricinus communis* L.) hay còn gọi là cây đu đủ tía, thân gỗ nhỏ, có nguồn gốc từ Ấn Độ, cây này phân bố rộng rãi ở các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới. Thành phần chính của lá cây thầu

dầu bao gồm 3 monoterpenoid (1,8-cineole, camphor và  $\alpha$ -pinene) và 1 sesquiterpenoid ( $\beta$ -caryophyllene) (Darmanin *et al.*, 2009). Hiện nay, chiết xuất từ cây thầu dầu đã được nghiên cứu và ứng dụng nhiều trong y học (chất chống ung thư, chống oxy hóa, kháng khuẩn, ...) (Rana *et al.*, 2012). Theo kết quả nghiên cứu của Immanuel *et al.* (2004), cao chiết thầu dầu có khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* (MTC-451 – Viện Công nghệ vi sinh, Ấn Độ) với đường kính vòng kháng khuẩn  $20,3 \pm 0,62$  mm. Tuy nhiên, ở báo cáo này không đề cập đến nồng độ cao chiết thầu dầu dùng để thực hiện khảo sát hoạt tính kháng khuẩn. Naz and Bano (2012) đã nghiên cứu tính kháng khuẩn của các cao chiết lá cây thầu dầu từ các dung môi methanol, ethanol và nước, kết quả khảo sát cho thấy cao chiết thầu dầu có tiềm năng kháng lại vi khuẩn Gram âm và Gram dương (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*). Bên cạnh đó, một số nghiên cứu khác về hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết thầu dầu cũng cho ra kết quả tương tự (Kota and Manthri, 2011; Jeyaseelan and Jashothan, 2012). Hay cao chiết thầu dầu có khả năng kháng vi khuẩn *Vibrio harveyi* và *V. parahaemolyticus* tốt với đường kính vòng kháng khuẩn 18,0 mm, MIC ở nồng độ 1,25 mg/ml, MBC ở nồng độ 2,5 mg/ml trên chủng *V. harveyi*; và tương ứng 17,5 mm, 2,5 mg/ml, 5,0 mg/ml trên chủng *V. parahaemolyticus* (Hong Mộng Huyền và *ctv.* 2018). Ngoài ra, thầu dầu được dùng làm chất giàu hóa cho *Artemia*, sau đó dùng làm thức ăn cho ấu trùng tôm *Penaeus indicus*, với mục tiêu chống lại mầm bệnh vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (Immanuel *et al.*, 2004). Từ đó nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tác động của cao chiết thầu dầu lên hệ miễn dịch không đặc hiệu của tôm thẻ chân trắng, làm cơ sở việc đề xuất biện pháp phòng bệnh trên tôm thẻ chân trắng.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Cao chiết thầu dầu (*R. communis* L.) được chuẩn bị bằng cách sấy khô lá thầu dầu và nghiền thành bột. Bột thầu dầu được ngâm với methanol có tỷ lệ 1:10 trong 3 ngày. Sau đó dịch chiết được lọc qua giấy lọc Whatman No. 1 và cô quay chân không ở 48°C để loại bỏ dung môi, phần còn lại là cao chiết thầu dầu.

Tôm thẻ chân trắng (*P. vannamei*) ở giai đoạn PL15 được mua từ tập đoàn Việt Úc, tôm trước khi thí nghiệm được xác định âm tính với white spot syndrome virus (WSSV) và *V. parahaemolyticus* bằng kỹ thuật PCR, sau đó tôm được thuần dưỡng ở độ mặn 15‰ trong 15 ngày.

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* từ bộ sưu tập mẫu bệnh của Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Vi khuẩn *V. parahaemolyticus* được phục hồi trên môi trường nutrient agar bổ sung 1,5% NaCl (NA-1,5% NaCl) và ủ trong 24 giờ ở 28°C.

## 2.2 Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1 Thí nghiệm xác định sự tác động của cao chiết thảo dầu đến miễn dịch của tôm thẻ chân trắng

Cao chiết thảo dầu được trộn với thức ăn (Grobest No.1, 40% đạm) có nồng độ lần lượt là 0,5; 1,0 và 1,5%. Sau đó, thức ăn được áo với dầu mực để ngăn sự phân tán của cao chiết trong nước. Thức ăn được để khô tự nhiên và trữ ở 4°C trong suốt quá trình cho tôm ăn.

Tôm thẻ chân trắng được nuôi trong bể 0,5 m<sup>3</sup> với mật độ 75 con/bể. Các thông số môi trường được duy trì phù hợp trong suốt quá trình nuôi như độ mặn 15‰, nước bể nuôi được sục khí liên tục. Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên, bao gồm 4 nghiệm thức, trong đó 3 nghiệm thức bổ sung cao chiết thảo dầu với nồng độ lần lượt là 0 (đối chứng), 0,5; 1,0 và 1,5%, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Tôm thẻ chân trắng được ăn thức ăn bổ sung cao chiết thảo dầu liên tục trong 60 ngày, cho tôm ăn lượng thức ăn bằng 15% trọng lượng thân với chế độ 4 lần/ngày. Mẫu tôm được thu vào thời điểm 30 và 60 ngày nuôi với số mẫu là 9 con/nghiệm thức để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch. Các chỉ tiêu theo dõi trong thí nghiệm gồm có thông số huyết học như tổng số tế bào máu (total haemocyte count - THC), bạch cầu có hạt - large granular cells (LGC), bạch cầu không hạt - hyaline cells (HC); hoạt tính PO (phenoloxidase) và hoạt tính SOD (superoxide dismutase).

### 2.2.2 Thí nghiệm xác định khả năng đề kháng với *V. parahaemolyticus* của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung cao chiết thảo dầu

Tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung cao chiết thảo dầu sau 30 ngày được cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp ngâm (Loc *et al.*, 2013), nồng độ vi khuẩn cảm nhiễm thông qua thí nghiệm xác định giá trị LD<sub>50</sub>, liều gây chết tôm với tỷ lệ 50% (0,7x10<sup>8</sup> cfu/ml).

Cụ thể, thí nghiệm cảm nhiễm gồm 5 nghiệm thức và lặp lại 3 lần với (i) nghiệm thức 0%: Không bổ sung cao chiết và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* (đối chứng dương); (ii) nghiệm thức 0,5%: Bổ sung cao chiết mức 0,5% và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*; (iii) nghiệm thức 1,0%: Bổ sung cao chiết mức 1,0% và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*; (iv) nghiệm thức 1,5%: Bổ sung

cao chiết mức 1,5% và cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*; (v) nghiệm thức đối chứng: Không bổ sung cao chiết và cảm nhiễm với môi trường nutrient broth bổ sung 1,5% NaCl (NB-1,5% NaCl) (đối chứng âm). Tôm được bố trí trong bể kính có thể tích 50 lít, độ mặn là 15‰ và được sục khí liên tục với số lượng 18 con/bể, trong đó 15 con để theo dõi tỷ lệ sống sau 14 ngày cảm nhiễm và 3 con/bể để xác định các chỉ tiêu miễn dịch (thông số huyết học, PO, SOD) ở thời điểm 3 ngày cảm nhiễm. Ngoài ra tôm chết sau cảm nhiễm được ghi nhận dấu hiệu bệnh lý và tái định danh lại vi khuẩn gây nhiễm bằng kỹ thuật PCR.

Tỷ lệ sống (%) = (Tổng số tôm thí nghiệm - Tổng số tôm thí nghiệm chết) × 100

### 2.2.3 Phương pháp phân tích các chỉ tiêu miễn dịch

Các mẫu tôm được phân tích các chỉ tiêu miễn dịch bao gồm: (i) xác định tổng số tế bào bạch cầu (THC) (Le Moullac *et al.*, 1997), định loại bạch cầu (Cornick and Stewart, 1978), (iii) xác định hoạt tính của phenoloxidase (PO) (Hernández-Lospez *et al.*, 1996).

### 2.2.4 Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Qui trình PCR phát hiện vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với thành phần hóa chất tham gia phản ứng và điều kiện chu kỳ nhiệt được thực hiện theo phương pháp của Sritunyalucksana *et al.* (2014), sản phẩm khuếch đại có kích thước 230 bp.

## 2.3 Xử lý số liệu

Các số liệu được nhập liệu và xử lý bằng phần mềm Excel. So sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức thông qua phân tích ANOVA 1 nhân tố với phép thử Duncan ở mức ý nghĩa (p<0,05) bằng chương trình SPSS 20.0.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Tác động của cao chiết thảo dầu lên chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng

#### Tổng tế bào máu

Ở thời điểm 30 ngày nuôi, tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức ăn thức ăn có bổ sung cao chiết thảo dầu (0,5; 1,0; 1,5%) đều có hàm lượng tổng tế bào máu (THC) tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng (0%), nhưng chỉ ở nghiệm thức bổ sung 0,5% và 1,0% cao chiết thảo dầu có sự khác biệt thống kê với nghiệm thức đối chứng (p<0,05). Hàm lượng THC đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,0% với giá trị 15,42x10<sup>6</sup> tb/ml. Hàm lượng THC ở thời điểm 60 ngày cũng có kết quả tương tự, cụ thể là tôm ăn thức ăn bổ sung cao chiết thảo dầu 0,5% và 1,0% khác biệt có ý nghĩa thống kê (P<0,05) so với 2 nghiệm

thức còn lại (0; 1,5%), trong đó nghiệm thức bổ sung 1,0% có giá trị THC cao nhất với  $17,84 \times 10^6$  tb/ml (Bảng 1).

**Bảng 1: Tổng tế bào máu (THC), bạch cầu có hạt (LGC), bạch cầu không hạt (HC) của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung cao chiết thầu dầu**

	THC ( $\times 10^6$ tb/ml)	LGC ( $\times 10^6$ tb/ml)	HC ( $\times 10^6$ tb/ml)
<b>30 ngày</b>			
0,5%	11,96 $\pm$ 1,36 <sup>b</sup>	1,13 $\pm$ 0,36 <sup>a</sup>	10,83 $\pm$ 1,11 <sup>b</sup>
1,0%	15,42 $\pm$ 1,08 <sup>c</sup>	1,74 $\pm$ 0,40 <sup>b</sup>	13,69 $\pm$ 0,79 <sup>c</sup>
1,5%	10,95 $\pm$ 1,48 <sup>ab</sup>	1,17 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	9,78 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>
0%	10,34 $\pm$ 0,89 <sup>a</sup>	1,16 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	9,18 $\pm$ 0,69 <sup>a</sup>
<b>60 ngày</b>			
0,5%	14,94 $\pm$ 1,14 <sup>b</sup>	1,58 $\pm$ 0,57 <sup>a</sup>	13,36 $\pm$ 0,98 <sup>b</sup>
1,0%	17,84 $\pm$ 1,56 <sup>c</sup>	1,99 $\pm$ 0,79 <sup>a</sup>	15,85 $\pm$ 1,10 <sup>c</sup>
1,5%	13,43 $\pm$ 1,56 <sup>a</sup>	1,41 $\pm$ 0,49 <sup>a</sup>	12,01 $\pm$ 1,73 <sup>a</sup>
0%	12,80 $\pm$ 0,82 <sup>a</sup>	1,37 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>	11,43 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>

Giá trị trung bình  $\pm$  độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột mang mẫu tự (a,b,c) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

Đồng thời, khi xác định sự biến động về hàm lượng từng loại bạch cầu (bạch cầu có hạt - LGC, bạch cầu không hạt - HC) trên tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức bổ sung cao chiết thầu dầu tại thời điểm 30 ngày. Kết quả cho thấy (Bảng 1) ở các nghiệm thức bổ sung 1,0% cao chiết thầu dầu khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) với giá trị  $1,74 \times 10^6$  tb/ml so với các nghiệm thức bổ sung 0,5%, 1,5% và nghiệm thức đối chứng. Hàm lượng bạch cầu không hạt ở nghiệm thức bổ sung 0,5% ( $10,83 \times 10^6$  tb/ml) và 1,0% ( $13,69 \times 10^6$  tb/ml) lại có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức bổ sung 1,5% và nghiệm thức đối chứng. Tại thời điểm 60 ngày, hàm lượng HC của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn có bổ sung cao chiết thầu dầu 0,5% ( $13,36 \times 10^6$  tb/ml), 1,0% ( $15,85 \times 10^6$  tb/ml) có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức bổ sung 1,5% và đối chứng (tương ứng, 12,01 và  $11,43 \times 10^6$  tb/ml), nhưng lại không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) về hàm lượng LGC giữa các nghiệm thức bổ sung 0,5; 1,0; 1,5% và nghiệm thức đối chứng với giá trị dao động trong khoảng 1,37 đến  $1,99 \times 10^6$  tb/ml, tuy nhiên lượng LGC trong máu tôm chỉ gia tăng đáng kể ở nồng độ 1,0% chiết xuất ( $p < 0,05$ ).

Từ kết quả trên cho thấy việc bổ sung cao chiết thầu dầu giúp gia tăng hàm lượng tế bào máu cũng như từng loại bạch cầu ở tôm thẻ chân trắng sau 30 và 60 ngày bổ sung. Trong đó, tôm ở nồng độ bổ sung 1% cao chiết thầu dầu có giá trị cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05\%$ ) so với các nghiệm thức còn lại. Tayag *et al.* (2010) thử nghiệm

tiêm chiết xuất tảo xoắn *Spirulina platensis* vào tôm thẻ chân trắng, nghiệm thức tiêm 20  $\mu\text{g/g}$  có hàm lượng THC, HC, GC cao hơn đáng kể so với nghiệm thức đối chứng (tôm tiêm nước muối sinh lý) ở 24 - 48 giờ. Ngoài ra, khi ngâm tôm thẻ chân trắng trong nước có chứa chiết xuất *S. platensis* ở nồng độ 400 và 600 mg/L trong 0,5 - 4 giờ, thì kết quả cũng cho thấy có sự gia tăng hàm lượng THC, HC, GC cao hơn so với đối chứng. Một thí nghiệm khác trên tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung chiết xuất *Gynura bicolor* với các nồng độ khác nhau 0,5; 1,0; 2,0 g/kg thức ăn trong 7, 14, 28 ngày. *Gynura bicolor* là cây thuộc họ cúc, loài này được Roxb và Willd mô tả khoa học đầu tiên năm 1838, chúng phân bố rộng rãi ở một số khu vực thuộc Châu Á; kết quả thí nghiệm này cho thấy các chỉ số miễn dịch như tổng số lượng hemocyte (THC), phenoloxidase (PO), superoxide dismutase (SOD), và hoạt tính lysozyme có sự tăng lên tương ứng với hàm lượng chiết xuất và thời gian. Trong đó, nghiệm thức bổ sung 2 g/kg có sự gia tăng THC sau 7 ngày và nghiệm thức bổ sung 1 g/kg ở 14 ngày nuôi ( $p < 0,05$ ), tuy nhiên THC của nghiệm thức bổ sung 0,5 g/kg không có sự khác biệt với đối chứng sau 28 ngày nuôi (Wu *et al.*, 2015). Máu là thành phần quan trọng trong quá trình đáp ứng miễn dịch của sinh vật nói chung và của tôm nói riêng. Tế bào máu có vai trò rất quan trọng trong quá trình đáp ứng miễn dịch của giáp xác, khi có vật thể lạ tấn công vào cơ thể thì máu thực hiện chức năng của mình để chống lại vật thể lạ như thực bào, tạo thể bao, thể hạch, melanin hóa, hoạt hóa hệ thống Pro-PO và sự chết của tế bào. Trong đó, mỗi loại tế bào máu lại có chức năng khác nhau, như tế bào bán hạt và tế bào có hạt tham gia vào quá trình melanin hóa, sự chết của tế bào; một ít tế bào bán hạt và tế bào không hạt tham gia vào quá trình thực bào. Thông thường, mỗi loài có hàm lượng tế bào máu nhất định, nhưng ở mỗi giai đoạn phát triển thì hàm lượng này có sự biến đổi (Söderhäll and Cerenius, 1992).

**Hoạt tính PO, SOD**

Thời điểm 30 ngày, tôm thẻ chân trắng ở nghiệm thức bổ sung 1,0% cao chiết thầu dầu có hoạt tính PO cao nhất kể đến là ở nghiệm thức bổ sung 0,5%, tuy nhiên ở nghiệm thức bổ sung 1% cao chiết thầu dầu khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức bổ sung 1,5% và đối chứng, nghiệm thức bổ sung 0,5% không có sự khác biệt có ý nghĩa ( $p > 0,05$ ) so với nghiệm thức bổ sung 1,0; 1,5% và đối chứng. Kết quả hoạt tính PO của tôm ở giai đoạn 60 ngày cũng tương tự, tôm ở nghiệm thức bổ sung 1,0% cao chiết thầu dầu không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức bổ sung 0,5% nhưng vẫn khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05\%$ ) so với nghiệm thức bổ sung 1,5% và đối chứng

(Bảng 2). Qua đó, tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung 1% cao chiết thảo dầu có hoạt tính PO cao nhất ở thời điểm 30 ngày và 60 bổ sung.

**Bảng 2: Hoạt tính PO (490 nm), SOD (560 nm) của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung cao chiết thảo dầu**

	PO	SOD
<b>30 ngày</b>		
0,5%	0,159±0,008 <sup>ab</sup>	0,020±0,003 <sup>a</sup>
1,0%	0,163±0,009 <sup>b</sup>	0,018±0,003 <sup>a</sup>
1,5%	0,151±0,011 <sup>a</sup>	0,020±0,002 <sup>a</sup>
0%	0,150±0,012 <sup>a</sup>	0,021±0,003 <sup>a</sup>
<b>60 ngày</b>		
0,5%	0,165±0,012 <sup>ab</sup>	0,019±0,003 <sup>a</sup>
1,0%	0,176±0,013 <sup>b</sup>	0,017±0,003 <sup>a</sup>
1,5%	0,160±0,012 <sup>a</sup>	0,019±0,004 <sup>a</sup>
0%	0,154±0,014 <sup>a</sup>	0,019±0,005 <sup>a</sup>

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột mang mẫu tự (a,b,c) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $P > 0,05$ )

Hoạt tính PO là một thành phần quan trọng trong hệ thống miễn dịch của giáp xác, chúng được hoạt hóa và lưu trữ bởi bạch cầu có hạt và bạch cầu bán hạt. Sự hoạt hóa của hệ thống Pro-PO dẫn đến sản xuất melanin, là một sắc tố màu nâu sẫm chịu trách nhiệm khử hoạt tính của các tác nhân xâm nhập và giúp phục hồi tổn thương lớp biểu bì. Hệ thống này được kích hoạt khi bị tác động bởi các thành phần của vách tế bào vi khuẩn, chẳng hạn như lipopolysaccharide, peptidoglycan,  $\beta$ -1,3-glucan (Ashida and Yamazaki, 1990; Sritunyalucksana and Söderhäll, 2000). Tayag *et al.* (2010) thử nghiệm tiêm chiết xuất từ tảo xoắn *Spirulina platensis* vào tôm thẻ chân trắng với nồng độ 10 và 20  $\mu\text{g/g}$  kết quả cho thấy sự gia tăng đáng kể hoạt tính PO sau 12 giờ. Đồng thời khi ngâm tôm thẻ chân trắng trong chiết xuất *S. platensis* (400 và 600 mg/L) cũng giúp tăng hoạt tính PO ở 0,5 giờ sau khi ngâm. Một thí nghiệm khác về tác động của zingerone (chiết xuất từ gừng) đến tôm thẻ chân trắng, cụ thể hoạt tính PO của tôm thẻ chân trắng khi bổ sung zingerone vào thức ăn liên tục trong 56 ngày tăng cao hơn ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng. Hoạt tính PO đạt giá trị cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 5 mg/kg (0,36), kế tiếp là 2,5 mg/kg và 1,0 mg/kg (tương ứng, 0,35 và 0,32) và cao hơn so với nghiệm thức đối chứng (Chang *et al.*, 2012). Tương tự, tôm sú ăn thức ăn bổ sung chiết xuất nghệ với nồng độ 25 và 50 mg/kg thức ăn cũng ghi nhận sự gia tăng đáng kể hoạt tính PO ( $p < 0,05$ ) so với đối chứng, tương ứng với giá trị PO cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 25 mg/kg; kế đến là 50 mg/kg và cuối cùng là nhóm đối chứng (Malar and Charles, 2013). Hỗn hợp chiết xuất thảo dược (*Acalypha indica*, *Hygrophila spinosa*, *Picrorhiza kurooa*, *Tinospora cordifolia* và

*Zingiber officinale*) được bổ sung vào thức ăn tôm thẻ đuôi đỏ (*Fenneropenaeus indicus*) trong 60 ngày. Kết quả cho thấy hoạt tính PO đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 2000 mg/kg thức ăn và sau khi cảm nhiễm với *V. harveyi*, giá trị PO cao nhất được tìm thấy sau 210 phút và 240 phút (Rajeswari *et al.*, 2012).

Đồng thời kết quả Bảng 2 cho thấy hoạt tính SOD của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung cao chiết thảo dầu và nghiệm thức đối chứng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) ở cả thời điểm 30 ngày và 60 ngày, với giá trị dao động 0,011 - 0,021. Qua đó, có thể thấy việc bổ sung cao chiết thảo dầu vào thức ăn không giúp gia tăng hoạt tính SOD trong máu tôm thẻ chân trắng. Trong quá trình tiếp xúc và nhận biết các tác nhân gây bệnh, các enzyme chủ như NADPH-oxidase được kích hoạt, làm tăng sự tiêu thụ oxy dẫn tới việc tạo ra các gốc tự do như anion superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) và hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Muñoz *et al.*, 2000; Rodriguez and Le Moullac, 2000). Các gốc tự do này được xem là những chất oxy hóa mạnh có thể trực tiếp giết chết sinh vật xâm nhập. Tuy nhiên, các gốc tự do không phân biệt tế bào vật chủ với tế bào vi khuẩn, vì vậy chúng có thể gây hại cho cơ thể vật chủ. Hoạt tính SOD được sinh ra nhằm cân bằng các gốc tự do trong cơ thể vật chủ (Fridovich, 1995). Tuy nhiên một số chất được chiết xuất từ thảo dược có khả năng kích thích tăng cường hệ miễn dịch của tôm thẻ chân trắng, như rutin được xem là chất kích thích miễn dịch vì có hoạt tính chống oxy hóa mạnh được chiết xuất từ cây hương xuân (*Toona sinensis*). Nhằm kiểm tra vai trò của rutin với khả năng đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu (THC, PO và SOD) của tôm thẻ chân trắng, một nghiên cứu đã được thực hiện bằng cách tiêm rutin vào tôm thẻ chân trắng rồi cho cảm nhiễm với vi khuẩn *V. alginolyticus*. Kết quả cho thấy hoạt tính PO của tôm tăng rõ rệt ( $p < 0,05$ ) khi tiêm rutin ở liều 20 và 50 mg/g sau 12 và 24 giờ. Tuy nhiên, hoạt tính SOD và THC của các nhóm tiêm chiết xuất và đối chứng đều không có sự khác biệt ở tất cả các liều tiêm (Hsieh *et al.*, 2008). Chất kích thích miễn dịch là những chất có thể tăng cường cơ chế miễn dịch không đặc hiệu và cung cấp sức đề kháng chống lại sinh vật gây bệnh. Gurib-Fakim (2006) cho rằng khả năng kích thích miễn dịch của thảo dược vẫn chưa được hiểu rõ và tác dụng kích thích miễn dịch của thảo dược chỉ có thể thấy được thông qua bốn hoạt động: Kích hoạt thực bào, kích thích nguyên bào sợi, tăng cường hô hấp và tăng tính di động của bạch cầu.

Nhìn chung, khi bổ sung cao chiết thảo dầu mức 1,0% giúp tôm thẻ chân trắng gia tăng đáng kể và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) ở các chỉ tiêu miễn dịch (THC, GC, HC và PO), ngoại trừ hoạt

tính SOD ở các thời điểm khảo sát (sau 30 - 60 ngày nuôi). Đồng thời, thí nghiệm tiếp tục thực hiện xác định khả năng kháng lại mầm bệnh của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung cao chiết thủy dầu, bằng việc cảm nhiễm tôm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, tác nhân gây bệnh gan tụy cấp tính.

**3.2 Khả năng đề kháng *Vibrio parahaemolyticus* của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung cao chiết thủy dầu**

Tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung cao chiết thủy dầu sau 30 ngày thì tiến hành cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, ghi nhận tỷ lệ sống sau 14 ngày cảm nhiễm và đồng thời tôm cảm nhiễm ở ngày thứ 3 được xác định các thông số miễn dịch ở mỗi nghiệm thức. Kết quả ghi nhận được trình bày thông qua Bảng 3, cho thấy hàm lượng THC của tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* tăng cao hơn so với nghiệm thức không cảm nhiễm vi khuẩn (đối chứng âm). Đồng thời ở nghiệm thức bổ sung cao chiết thủy dầu ở nồng độ 1,0% có hàm lượng THC cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm

thức còn lại. Kế đến là nghiệm thức bổ sung 0,5% cao chiết thủy dầu và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức bổ sung 1,5% và nghiệm thức không bổ sung cao chiết (0%, đối chứng dương). Hàm lượng GC và HC trong máu tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm tăng lên so với nghiệm thức không cảm nhiễm. Cụ thể là hàm lượng GC và HC cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1,0% (1,81 và  $14,16 \times 10^6$  tb/ml) và khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức còn lại (bao gồm nghiệm thức đối chứng âm - nghiệm thức không cảm nhiễm vi khuẩn).

Tương tự, hoạt tính PO của tôm thẻ chân trắng cảm nhiễm mầm bệnh tăng cao so với nghiệm thức không cảm nhiễm mầm bệnh (đối chứng âm). Cụ thể, hoạt tính PO của nghiệm thức 0,5% (0,170), nghiệm thức bổ sung 1,0% (0,188) khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức bổ sung 1,5% và 0% (nghiệm thức không bổ sung cao chiết thủy dầu – đối chứng dương) với giá trị tương ứng 0,165 và 0,159. Tuy nhiên, hoạt tính SOD vẫn không có sự khác biệt giữa các nghiệm thức sau khi cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* (Bảng 3).

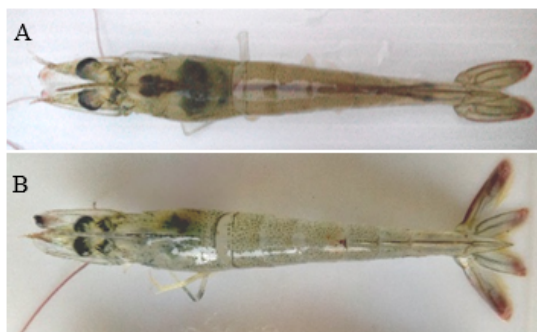
**Bảng 3: Hàm lượng THC, LGC, HC ( $\times 10^6$  tb/ml), PO (490 nm), SOD (560 nm) của tôm thẻ chân trắng ở thí nghiệm bổ sung cao chiết thủy dầu**

	THC	LGC	HC	PO	SOD
0,5%	12,62±1,13 <sup>c</sup>	1,66±0,35 <sup>ab</sup>	10,96±1,01 <sup>a</sup>	0,170±0,011 <sup>b</sup>	0,018±0,002 <sup>a</sup>
1,0%	15,97±1,20 <sup>d</sup>	1,81±0,60 <sup>b</sup>	14,16±1,10 <sup>b</sup>	0,188±0,009 <sup>c</sup>	0,017±0,003 <sup>a</sup>
1,5%	11,44±1,11 <sup>b</sup>	1,41±0,49 <sup>ab</sup>	10,03±0,93 <sup>a</sup>	0,165±0,010 <sup>a</sup>	0,019±0,003 <sup>a</sup>
0%	11,39±1,20 <sup>b</sup>	1,25±0,29 <sup>a</sup>	10,14±1,28 <sup>a</sup>	0,159±0,029 <sup>a</sup>	0,020±0,003 <sup>a</sup>
Đối chứng	10,68±1,06 <sup>a</sup>	1,17±0,45 <sup>a</sup>	95,09±1,25 <sup>a</sup>	0,152±0,012 <sup>a</sup>	0,021±0,002 <sup>a</sup>

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột mang mẫu tự (a,b,c, d) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

Bên cạnh đó, ghi nhận dấu hiệu bệnh lý và tỷ lệ sống của tôm sau 14 ngày cảm nhiễm, cụ thể là sau 12 - 15 giờ cảm nhiễm ở các nghiệm thức bổ sung 0; 0,5 và 1,5% tôm có dấu hiệu giảm hoạt động;

riêng nghiệm thức bổ sung 1,0% xuất hiện sau 28 giờ. Tôm cảm nhiễm ở ngày tiếp theo có dấu hiệu bơi lờ đờ ít hoạt động, bỏ ăn, ruột rỗng, gan tụy nhạt màu, teo và dai (Hình 1), các dấu hiệu bệnh lý trên tương tự với mô tả của Lightner *et al.* (2013).

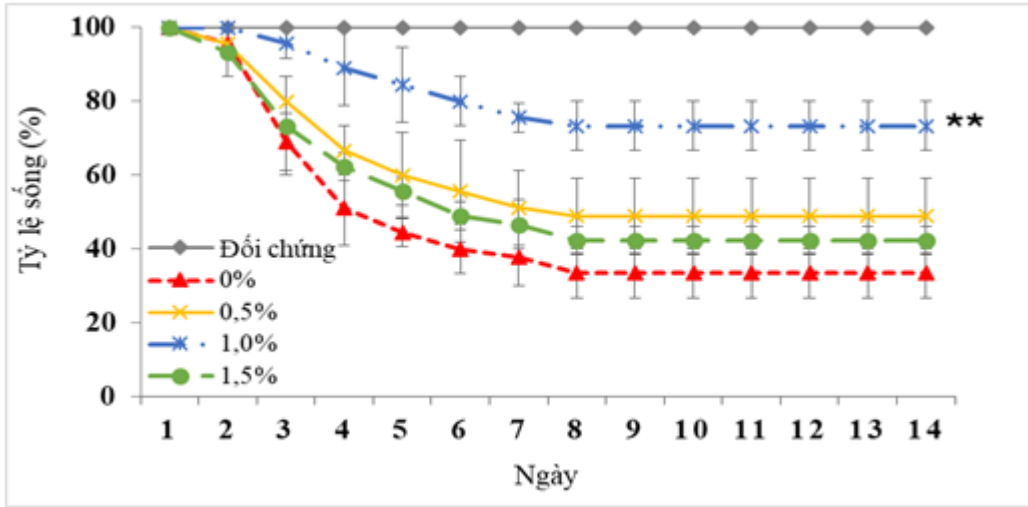


**Hình 1: Tôm thẻ chân trắng thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp**

A: Tôm bình thường có ruột đầy và gan tụy màu sắc bình thường; B: Tôm nhiễm bệnh nhạt màu ruột rỗng, gan tụy teo

Tôm bắt đầu chết vào ngày thứ 2 sau khi cảm nhiễm ở các nghiệm thức bổ sung 0; 0,5 và 1,5%; riêng nghiệm thức bổ sung 1,0% cao chiết thì tôm

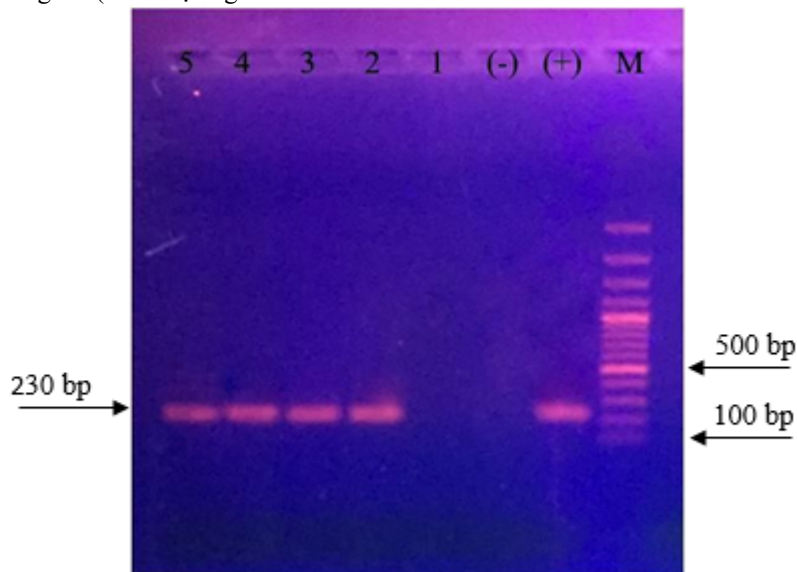
bắt đầu chết vào ngày thứ 3. Tỷ lệ chết của tôm ở các nghiệm thức tăng cao dần vào các ngày tiếp theo và tất cả các nghiệm thức đều ngưng chết vào ngày thứ 8 cho đến khi kết thúc thí nghiệm (Hình 2).



**Hình 2: Tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus***

Cụ thể, sau 14 ngày ở nghiệm thức bổ sung 1,0% cao chiết thầu dầu có tỷ lệ sống cao nhất với 73,33%, kế tiếp là nghiệm thức 0,5 và 1,5% tương ứng với 58,89 và 42,22%; tỷ lệ sống thấp nhất ở nghiệm thức không bổ sung thảo dược (0%, có cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*) với 33,33%. Trong khi đó, nghiệm thức đối chứng âm (tôm được ngâm với môi

trường NB) không xuất hiện tôm chết, tỷ lệ sống đạt 100% cho đến khi kết thúc thí nghiệm. Tôm hoạt động bình thường, gan tụy sẫm màu, ruột đầy thức ăn. Tôm thẻ chân trắng chết ở các nghiệm thức được chọn để kiểm tra PCR hai bước phát hiện vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, nhằm đánh giá lại quá trình cảm nhiễm.



**Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR phát hiện *V. parahaemolyticus***

Giếng M: Thang DNA 100 bp; Giếng (+): Đối chứng dương; Giếng (-): Đối chứng âm; Giếng 1: Nghiệm thức đối chứng không cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*; Giếng 2: Nghiệm thức 0% và cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*; Giếng 3, 4, 5: Tương ứng với nghiệm thức 0,5; 1; 1,5% cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*.

Ở các nghiệm thức cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* đều cho kết quả dương tính và sản phẩm khuếch đại thể hiện ở vạch 230 bp (giếng 2, 3, 4, 5) (Hình 3). Riêng mẫu ở nghiệm thức đối chứng âm, không cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* cho kết quả âm tính (Giếng 1). Kết quả PCR cho thấy tôm thẻ chân trắng thí nghiệm chết là do cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Nghiên cứu của Harikrishnan *et al.* (2011) cho thấy bổ sung chiết xuất lu lu đực (*Solanum nigrum*) vào khẩu phần ăn của tôm sú cũng giúp tăng lượng THC, GC và HC trong máu khi cảm nhiễm với *V. harveyi*. Bổ sung chiết xuất *S. nigrum* với nồng độ 0,1 và 1,0% giúp tăng đáng kể lượng THC và HC trong máu. Tuy nhiên, lượng GC trong máu tôm chỉ gia tăng đáng kể ở nồng độ 1,0% chiết xuất ( $p < 0,05$ ). Jayanthi *et al.* (2013) cũng cho rằng sử dụng chiết xuất diệp hạ châu (*Phyllanthus niruri*) giúp tăng cường khả năng miễn dịch của tôm. Cụ thể là khi cho ấu trùng tôm *Penaeus indicus* ăn thức ăn bổ sung chiết xuất *P. niruri* cho thấy sự gia tăng của THC khi cảm nhiễm với WSSV. Chỉ số THC tăng cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 200 mg/kg thức ăn ( $6,87 \times 10^3$  tb/ml), kế tiếp là 150 mg/kg ( $6,52 \times 10^3$  tb/ml), 100 mg/kg ( $5,67 \times 10^3$  tb/ml) và thấp nhất là nghiệm thức đối chứng với  $4,38 \times 10^3$  tb/ml. Tương tự, chiết xuất ethanol của lá cây đậu dầu (*Pongamia pinnata*) giúp tăng tỉ lệ sống của tôm sú (*Penaeus monodon*) khi gây nhiễm với WSSV. Tỷ lệ sống của tôm được bổ sung chiết xuất ở mức 200 và 300  $\mu\text{g/g}$  trọng lượng thân tương ứng là 40% và 80%. Nghiên cứu còn xác định hợp chất kháng virus (WSSV) phân lập từ lá cây đậu dầu được xác định là bis (2-methylheptyl) phthalate (Rameshthangam and Ramasamy, 2007). Nghiên cứu của Immanuel *et al.* (2004) sử dụng chiết xuất thầu dầu làm thức ăn cho tôm *Penaeus indicus* (PL30) liên tục trong 30 ngày. Kết quả ghi nhận tỷ lệ sống của tôm ở nghiệm thức bổ sung cao chiết thầu dầu (58,88%) cao hơn nghiệm thức đối chứng (24,44%); ngoài ra, các loại thảo dược khác được sử dụng trong thí nghiệm này cũng mang lại kết quả tương tự. Balasubramanian *et al.* (2008) nghiên cứu hoạt tính kháng virus (WSSV) trên tôm sú (*P. monodon*) của chiết xuất cây cỏ gà (*Cynodon dactylon*). Kết quả nghiên cứu cho thấy chiết xuất *C. dactylon* có hiệu quả cao trong việc phòng bệnh do WSSV; không có tôm chết ở nghiệm thức bổ sung 2% chiết xuất so với tỷ lệ chết 40% ở nghiệm thức bổ sung 1% chiết xuất. Tôm thẻ chân trắng được bổ sung cao chiết *Gynura bicolor* trong 6 ngày và cảm nhiễm với *V. alginolyticus*. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống của tôm ăn thức ăn bổ sung *G. bicolor* ở nồng độ 0,5; 1,0 và 2 g/kg thức ăn (36,7; 43,3 và 56,7%) cao hơn đáng kể ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng (23,3%). Ngoài ra, chiết xuất

cây *G. bicolor* còn có khả năng kháng WSSV ở nồng độ 2 g/kg thức ăn, đạt tỷ lệ sống đến 53,3% (Wu *et al.*, 2015).

Rampadarath *et al.* (2014) cho rằng chiết xuất từ lá cây thầu dầu có hoạt tính kháng khuẩn cao, có thể ức chế vi khuẩn gram âm và gram dương (*Bacillus algalicola*, *Listeria innocua*, *Viridibacillus arenosi*, *Escherichia coli*). Hoạt tính kháng khuẩn mạnh của chiết xuất thầu dầu là do trong lá có chứa terpenoids, tannins, phlobatannins, flavonoids và cardiac glycosides (Owoseni and Faboro, 2010). Cụ thể, (i) terpenoids chứa các dẫn xuất tinh dầu có khả năng ức chế vi khuẩn (Aureli *et al.*, 1992); (ii) tannins có khả năng kết hợp với các protein của vi khuẩn thông qua các liên kết không đặc hiệu như liên kết hydro và các hiệu ứng kỵ nước làm bất hoạt vi khuẩn (Butler, 1989); (iii) các cơ chế tạo hoạt tính kháng khuẩn của steroid bao gồm các enzyme ức chế được tạo thành bởi các hợp chất bị oxy hóa, có thể thông qua phản ứng với các nhóm sulfhydryl hoặc thông qua liên kết không đặc hiệu với các protein của vi khuẩn (Brantner and Grein, 1994). (iv) ngoài ra, saponin và flavonoid cũng được biết đến với khả năng kháng khuẩn tác động vào màng tế bào và protein của vi khuẩn (Akpata and Akinrimisi, 1977). Kết quả thí nghiệm cảm nhiễm cho thấy việc bổ sung cao chiết thầu dầu giúp tôm thẻ chân trắng gia tăng sức đề kháng với *V. parahaemolyticus*. Điều đáng lưu ý, nghiệm thức bổ sung 1,0% cho tỷ lệ sống cao hơn ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức bổ sung 0,5; 1,5% cao chiết. Điều này có thể giải thích là do một số hợp chất trong cao chiết lá thầu dầu khi được bổ sung liên tục trong thời gian dài với liều lượng lớn có thể gây ức chế đáp ứng miễn dịch của tôm. Theo Bigi *et al.* (2004) chiết xuất lá thầu dầu tươi hay bằng methanol cũng cho thấy có độc tính cao đối với một số loại côn trùng gây hại trên cây trồng.

#### 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Bổ sung cao chiết thầu dầu vào thức ăn tôm thẻ chân trắng với nồng độ 0,5% và 1,0% trong 30, 60 ngày giúp tăng cường các chỉ tiêu miễn dịch (THC, GC, HC và hoạt tính PO) và nồng độ 1% giúp tôm gia tăng tỷ lệ sống chống lại *V. parahaemolyticus*. Tiếp tục thực hiện thử nghiệm đánh giá tác động của cao chiết thầu dầu đối với tôm nuôi thực địa ngoài ao.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akpata, E.S., and Akinrimisi, E.O., 1977. Antibacterial activity of extracts from some African chewing sticks. College of Medicine University of Lagos P.M.B. 12003 Lagos, Nigeria. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology. 44(5): 717-722.



- Ashida, M., and H. I. Yamazaki. 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects with special reference to its activation. In: Ohnishi E. and Ishizaki H. (eds). *Molting and Metamorphosis*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 239–265.
- Aureli, P., Costantini, A., and Zolea, S., 1992. Antimicrobial activity of some plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*. 55(5): 344-348.
- Balasubramanian, G., Sarathi, M., Kumar, S.R., and Hameed, A.S., 2007. Screening the antiviral activity of Indian medicinal plants against white spot syndrome virus in shrimp. *Aquaculture*. 263(1): 15-19.
- Brantner, A., and Grein E., 1994. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*. 44(1): 35-40.
- Butler, L.G., 1989. Effects of Condensed Tannin on Animal Nutrition. In: Hemingway R.W., Karchesy J.J., Branham S.J. (eds). *Chemistry and Significance of Condensed Tannins*. Springer, Boston, MA. pp 391-402.
- Campa-Córdova, A.I., Hernández-Saavedra, N.Y., De Philippis, R., and Ascencio, F., 2002. Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Penaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish and shellfish immunology*. 12(4): 353-366.
- Chang, Y.P., Liu, C.H., Wu, C.C., Chiang, C.M., Lian, J.L., and Hsieh, S.L., 2012. Dietary administration of zingerone to enhance growth, non-specific immune response, and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) juveniles. *Fish & shellfish immunology*. 32(2): 284-290.
- Cornick, J.W., and Stewart, J.E., 1978. Lobster (*Homarus americanus*) hemocytes: Classification, differential counts, and associated agglutinin activity. *Journal of invertebrate pathology*. 31(2): 194-203.
- Darmanin, S., Wismayer, P.S., Podesta, C.M.T., Micallef, M.J., and Buhagiar, J.A., 2009. An extract from *Ricinus communis* L. leaves possesses cytotoxic properties and induces apoptosis in SK-MEL-28 human melanoma cells. *Natural product research*. 23(6): 561-571.
- Fridovich, I., 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual review of biochemistry*. 64(1): 97-112.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*. 27(1): 1-93.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C., Jawahar, S., and Heo, M.S., 2011. *Solanum nigrum* enhancement of the immune response and disease resistance of tiger shrimp, *Penaeus monodon* against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*. 318(1-2): 67-73.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., and Vargas-Albores, F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*. 113(1): 61-66.
- Hoess, J.A., Kafatos, F.C., Janewy, C.A., and Ezekowitz, R.A., 1999. Phylogenetic perspectives in immunity. *Science*. 284: 1313-1318.
- Holmblad, T., and Söderhäll, K., 1999. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*. 172(1): 111-123.
- Hồng Mộng Huyền, Võ Tấn Huy và Trần Thị Tuyết Hoa, 2018. Hoạt tính kháng khuẩn của một số cao chiết thảo dược kháng vi khuẩn gây bệnh ở tôm nuôi. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 54(2): 143-150.
- Hsieh, T.J., Wang, J.C., Hu, C.Y., Li, C.T., Kuo, C.M., and Hsieh, S.L., 2008. Effects of Rutin from *Toona sinensis* on the immune and physiological responses of white shrimp (*Penaeus vannamei*) under *Vibrio alginolyticus* challenge. *Fish & shellfish immunology*. 25(5): 581-588.
- Immanuel, G., Vincybai, V.C., Sivaram, V., Palavesam, A., and Marian, M.P., 2004. Effect of butanolic extracts from terrestrial herbs and seaweeds on the survival, growth and pathogen (*Vibrio parahaemolyticus*) load on shrimp *Penaeus indicus* juveniles. *Aquaculture*. 236(1-4): 53-65.
- Iwanaga, S., and Lee, B.L., 2005. Recent advances in innate immunity of invertebrate animals. *Journal of Biochemistry Molecular Biology*. 38: 128-150.
- Jayanthi, R., Malar, H.V., and Charles, P.M., 2013. Effect of *Phyllanthus niruri* on *Penaeus indicus* post larvae against WSSV infection. *International Journal of Research in Fisheries and Aquaculture*. 3: 130-135.