

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.124

## 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*

Hồng Mộng Huyền, Lê Quốc Việt, Trần Ngọc Hải và Trần Thị Tuyết Hoa\*

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Trần Thị Tuyết Hoa (email: [tthoa@ctu.edu.vn](mailto:tthoa@ctu.edu.vn))

### ABSTRACT

Infectious diseases of cultured shrimp are getting more and more complicated, especially the acute hepatopancreatic necrosis disease which appeared in 2009. Under these circumstances, herbal extracts have been considered as a safe preventive approach against diseases in aquaculture. Many herbal extracts have been determined with antimicrobial activity, growth promoters, improvement of the immunity and disease resistance of aquatic animals. In this study, herbal extracts from *Terminalia catappa* and *Phyllanthus urinaria* were supplemented at concentration of 1%, and 2% for whiteleg shrimp in 4 weeks. Then, impacts on growth performance and immune response of the experimental shrimp were evaluated. Results showed that (i) the *P. urinaria* and the *T. catappa* treatments at 1%, 2% of whiteleg shrimp after 4 weeks did not affect enhanced growth performance; (ii) the 1% *T. catappa* treatment could improve shrimp immune parameters (haematological parameters, phenoloxidase activity, and superoxide dismutase activity) and survival rate after being challenged with *V. parahaemolyticus*. The obtained results suggested potential applications of the extracts *T. catappa* and *P. urinaria* in commercial shrimp farming.

### TÓM TẮT

Bệnh truyền nhiễm trên tôm nuôi diễn biến ngày càng phức tạp, đặc biệt với sự xuất hiện của bệnh hoại tử gan tụy cấp tính vào năm 2009. Trong bối cảnh đó, ứng dụng chiết xuất thảo dược bổ sung vào thức ăn được xem như giải pháp an toàn để phòng bệnh trong nuôi thủy sản. Nhiều loại thảo dược được xác định có tác dụng kháng khuẩn, kích thích tăng trưởng, tăng cường miễn dịch, và khả năng kháng bệnh ở động vật thủy sản. Trong nghiên cứu này, chất chiết bàng (*Terminalia catappa*), điệp hạ châu thân đỏ (*Phyllanthus urinaria*) được bổ sung vào thức ăn ở nồng độ 1%, 2% cho tôm thẻ chân trắng trong 4 tuần, sau đó đánh giá tác động đến tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch. Kết quả ghi nhận: (i) bổ sung chất chiết điệp hạ châu thân đỏ, chất chiết bàng ở nồng độ 1%, 2% không ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng sau 4 tuần; (ii) nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết bàng giúp tôm thẻ chân trắng tăng cường các chỉ số miễn dịch (chỉ số huyết học, hoạt tính phenoloxidase, hoạt tính superoxide dismutase) và tỷ lệ sống khi cảm nhiễm với *Vibrio parahaemolyticus*. Những kết quả đạt được của nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng của chất chiết bàng, điệp hạ châu trong nuôi tôm thương phẩm.

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 27/04/2020

Ngày nhận bài sửa: 09/06/2020

Ngày duyệt đăng: 28/10/2020

### Title:

Effects of herbal extracts on the growth, non-specific immune responses and disease resistance of whiteleg shrimp (*Penaeus vannamei*) against *Vibrio parahaemolyticus*

### Từ khóa:

Chất chiết thảo dược, đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu, tăng trưởng, tôm thẻ chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus*

### Keywords:

Growth, herbal extract, immune response, *Vibrio parahaemolyticus*, whiteleg shrimp

Trích dẫn: Hồng Mộng Huyền, Lê Quốc Việt, Trần Ngọc Hải và 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.

## 1 GIỚI THIỆU

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (acute hepatopancreatic necrosis disease -AHPND) được xác định do *Vibrio parahaemolyticus* (Tran *et al.*, 2013) có plasmid mang gen độc tố PirA và PirB (*Photorhabdus* insect-related -Pir), AHPND đặc trưng bởi khả năng gây chết đột ngột, tỷ lệ chết lên đến 100% đàn tôm, gây bệnh trên tôm từ 30 đến 35 ngày sau khi thả nuôi (OIE, 2019). Ngoài ra, bệnh cũng xuất hiện ở giai đoạn tôm 46-96 ngày (De la Peña *et al.*, 2015). Đồng thời, AHPND cũng được xác định do *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. punensis* và *V. owensii* vì các chủng vi khuẩn này mang các gen độc tố có trình tự giống với plasmid gây bệnh AHPND (Kondo *et al.*, 2015; Dong *et al.*, 2017; Restrepo *et al.*, 2018; Xiaosha *et al.*, 2020). Do vậy, plasmid mang gen độc tố PirA và PirB gây bệnh AHPND được ghi nhận là phổ biến ở nhiều loài *Vibrio* spp. (Xiao *et al.*, 2017) và có thể được truyền từ loài vi khuẩn *Vibrio* sp. này sang loài vi khuẩn *Vibrio* sp. khác (Kondo *et al.*, 2015). Hiện nay, thuốc kháng sinh, chất khử trùng, chế phẩm sinh học là những nhóm thuốc, hóa chất, chất bổ sung chủ yếu được sử dụng để phòng trị AHPND (FAO, 2013; De Schryver *et al.*, 2014; Boonyawiwat *et al.*, 2017). Tuy nhiên, những nhóm chất này đã được biết đến với nhiều tác dụng không mong muốn như ảnh hưởng tiêu cực đến môi trường, sức khỏe vật nuôi, chất lượng sản phẩm thủy sản cũng như hiệu quả trong quá trình điều trị (Miranda and Zemelman, 2002; Seyfried *et al.*, 2010).

Nhiều báo cáo khoa học đã chứng minh hiệu quả của việc sử dụng thảo dược trong nuôi trồng thủy sản. Các kết quả nghiên cứu *in-vitro* và *in-vivo* cho thấy tiềm năng của việc sử dụng chất chiết xuất thảo dược giúp tăng khả năng đề kháng với mầm bệnh ở động vật thủy sản (Citarasu, 2010). Trong đó, hoạt tính kháng khuẩn của thảo dược được nghiên cứu và ứng dụng nhiều nhất trong nuôi trồng thủy sản (Castro *et al.*, 2008). Bên cạnh đó, chất chiết xuất thảo dược còn có khả năng kích thích tăng trưởng ở động vật thủy sản, cụ thể giúp tăng cường khả năng hấp thu thức ăn, kích thích tiêu hóa và gia tăng tỷ lệ sống (Immanuel *et al.*, 2004). Ngoài ra, chất chiết xuất thảo dược có thể được sử dụng như là một phương pháp tăng cường miễn dịch (Kirubakaran *et al.*, 2010). Điều này cho thấy tiềm năng hóa chất thực vật có thể thay thế cho một số hóa chất tổng hợp hay kháng sinh trong hoạt động nuôi trồng thủy sản (Sivaram *et al.*, 2004).

Tuy nhiên, ở Việt Nam, thông tin khoa học về việc sử dụng chất chiết thảo dược kháng khuẩn, tăng

cường miễn dịch vẫn còn hạn chế, đặc biệt là sử dụng thảo dược trong phòng bệnh vi khuẩn gây bệnh trên tôm nuôi. Do vậy, nghiên cứu “Ảnh hưởng của chất chiết bằng, điệp hạ châu thân đỏ lên tốc độ tăng trưởng, đáp ứng miễn dịch và khả năng kháng *V. parahaemolyticus* của tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*)” được thực hiện nhằm xác định hiệu quả và tiềm năng ứng dụng hóa chất thực vật trong nuôi tôm thương phẩm.

## 2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Vật liệu nghiên cứu

Lá bàng, thân và lá điệp hạ châu thân đỏ sử dụng cho nghiên cứu được thu hái từ các khu vực ở thành phố Cần Thơ và tỉnh Hậu Giang thuộc Đồng bằng sông Cửu Long.

Tôm thẻ chân trắng (1-2 g) được thuần dưỡng trong bể composite 2 tuần và được xác định âm tính với các mầm bệnh WSSV, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* bằng kỹ thuật PCR.

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (CM5) sử dụng cho thí nghiệm cảm nhiễm được chọn từ bộ sưu tập vi khuẩn của Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Phương pháp chiết xuất thảo dược

Lá bàng, thân và lá điệp hạ châu thân đỏ (DHC) được rửa sạch, để ráo, sấy khô ở 60°C. Sau đó, thảo dược được nghiền thành bột. Chiết tách thảo dược bằng kỹ thuật ngâm dầm. Cụ thể, bột thảo dược được ngâm với methanol (Chemsol, Việt Nam) theo tỷ lệ 1:10 trong 3 ngày, sau đó loại bỏ phần bã cây ra khỏi dung dịch chiết bằng giấy lọc Whatman No.1 (Whatman, Anh). Methanol được thu hồi bằng máy cô quay chân không ở 50°C, chất còn lại sau cô quay là cao tổng (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007).

#### 2.2.2 Thí nghiệm 1. Khả năng tăng cường miễn dịch và tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng được cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết thảo dược

**Chuẩn bị thức ăn:** chất chiết bằng và DHC được áo ngoài viên thức ăn (Grobest, Đài Loan) với nồng độ 1%, 2%, để khô tự nhiên ở nhiệt độ phòng và tiếp tục áo ngoài viên thức ăn bằng dầu mực (Vemedim, Việt Nam) với liều lượng 2%. Đồng thời, thức ăn không bổ sung thảo dược được áo ngoài bằng dầu mực và sử dụng cho tôm của nghiệm thức đối chứng. Các loại thức ăn được bảo quản ở 4°C.

**Bố trí thí nghiệm:** Thí nghiệm được bố trí với 5 nghiệm thức và 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức,

bao gồm: Nghiệm thức ĐC: không bổ sung thảo dược (đối chứng); Nghiệm thức B1: bổ sung 1% chất chiết bàng; Nghiệm thức B2: bổ sung 2% chất chiết bàng; Nghiệm thức D1: bổ sung 1% chất chiết điệp hạ châu thân đỏ; Nghiệm thức D2: bổ sung 2% chất chiết điệp hạ châu thân đỏ.

Tôm thí nghiệm được cho ăn thức ăn có bổ sung thảo dược liên tục trong 4 tuần, cho ăn 4 lần/ngày với 3-5% trọng lượng cơ thể.

### Các chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm

Tôm (9 tôm/nghiệm thức) được thu mẫu để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch vào tuần 2 và tuần 4 của thí nghiệm. Các chỉ tiêu miễn dịch được phân tích bao gồm: (i) tổng số tế bào máu (total hemocyte count- THC) (Le Moullac *et al.*, 1997), định loại bạch cầu (Cornick and Stewart, 1978), (iii) hoạt tính phenoloxidase (PO) (Hernández-Lospez *et al.*, 1996), (iv) hoạt tính superoxide dismutase (SOD) (Beauchamp and Fridovich, 1971).

Tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm sau khi kết thúc thí nghiệm được ghi nhận vào tuần 4 của thí nghiệm. Các chỉ tiêu tăng trưởng được xác định bao gồm: tốc độ tăng trưởng tuyệt đối DWG (g/ngày) =  $(W_f - W_i) / T$ ; tốc độ tăng trưởng đặc biệt SGR (%/ngày) =  $\{(\ln W_f - \ln W_i) / T\} \times 100$ ; Hệ số tiêu tốn thức ăn FCR =  $[Lượng\ thức\ ăn\ cho\ ăn / (W_f - W_i)]$ . Trong đó:  $W_f$  là khối lượng cuối cùng,  $W_i$  là khối lượng ban đầu và  $T$  là tổng thời gian thí nghiệm; Tỷ lệ sống (%) =  $(số\ lượng\ tôm\ thời\ điểm\ kết\ thúc\ thí\ nghiệm / số\ lượng\ tôm\ thời\ điểm\ bố\ trí\ thí\ nghiệm) \times 100$ .

#### 2.2.3 Thí nghiệm 2. Khả năng đề kháng với *V. parahaemolyticus* của tôm thẻ chân trắng được cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết thảo dược

Sau 4 tuần được bổ sung chất chiết bàng và DHC, tôm được cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp ngâm (Tran *et al.*, 2013). Mật độ vi khuẩn cảm nhiễm được xác định thông qua thí nghiệm xác định giá trị LD<sub>50</sub>, liều gây chết tôm với tỷ lệ 50% ( $1,9 \times 10^7$  CFU/mL).

Thí nghiệm cảm nhiễm được bố trí với 6 nghiệm thức, bao gồm: Nghiệm thức ĐC(-): không cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*; Nghiệm thức ĐC(+): không bổ sung thảo dược + *V. parahaemolyticus*; Nghiệm thức B1: bổ sung 1% chất chiết bàng + *V. parahaemolyticus*; Nghiệm thức B2: bổ sung 2% chất chiết bàng + *V. parahaemolyticus*; Nghiệm

thức D1: bổ sung 1% chất chiết DHC+ *V. parahaemolyticus*; Nghiệm thức D2: bổ sung 2% chất chiết DHC+ *V. parahaemolyticus*

Tôm thẻ chân trắng sau khi cảm nhiễm vẫn tiếp tục cho ăn thức ăn có bổ sung thảo dược theo chế độ bổ sung như ở thí nghiệm cho ăn.

**Chỉ tiêu thu mẫu:** Tôm thí nghiệm được theo dõi và ghi nhận dấu hiệu lâm sàng, số lượng tôm chết hàng ngày trong vòng 14 ngày thí nghiệm. Sau đó, tỷ lệ chết tích lũy của từng nghiệm thức được xác định với công thức: Tỷ lệ chết tích lũy (%) =  $(số\ lượng\ tôm\ chết / số\ lượng\ tôm\ lúc\ bố\ trí\ thí\ nghiệm) \times 100$ .

**Định danh vi khuẩn cảm nhiễm:** Tôm có dấu hiệu lờ đờ được phân lập vi khuẩn trên môi trường TCBS và định danh vi khuẩn *V. parahaemolyticus* với qui trình nested-PCR (Dangtip *et al.*, 2015).

### 2.3 Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm SPSS 20.0 cho phân tích phương sai 1 nhân tố (One-way ANOVA) bằng kiểm định Duncan với độ tin cậy 95% để so sánh sự khác biệt giữa các trung bình của các nghiệm thức; kiểm định Independent Samples T- test với độ tin cậy 95% để so sánh sự khác biệt giữa trung bình của hai nhíp thu mẫu trên cùng nghiệm thức.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Tác động của chế độ cho ăn bổ sung chất chiết bàng và điệp hạ châu thân đỏ lên tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng

Tốc độ tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng được xác định sau 4 tuần ăn thức ăn bổ sung chất chiết bàng và DHC với hai mức bổ sung 1% và 2%. Cụ thể, khối lượng tôm nuôi sau 4 tuần ở các nghiệm thức dao động từ 4,99 – 6,23 g/con. Trong đó, khối lượng tôm ở các nghiệm thức có bổ sung chất chiết DHC (1% và 2%) cao hơn nghiệm thức bổ sung chất chiết bàng (1%) và nghiệm thức đối chứng nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Tương tự, tốc độ tăng trưởng khối lượng tuyệt đối (DWG) và tương đối (SGR) của tôm thẻ chân trắng cao nhất là ở nghiệm thức bổ sung 1%, 2% DHC, 1% chất chiết bàng cũng cao hơn nghiệm thức đối chứng ( $p > 0,05$ ). Riêng tôm ở nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết DHC có tốc độ tăng trưởng khối lượng tương đối khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng ( $p < 0,05$ ) (Bảng 1).

**Bảng 1: Tốc độ tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng sau 4 tuần ăn thức ăn bổ sung chất chiết bàng và điệp hạ châu thân đỏ**

Nghiệm thức	W <sub>i</sub> (g)	W <sub>f</sub> (g)	DWG (g/ngày)	SGR <sub>w</sub> (%/ngày)
ĐC	0,95±0,17	5,21±0,45 <sup>ab</sup>	0,15±0,02 <sup>ab</sup>	6,07±0,32 <sup>ab</sup>
B1	0,95±0,17	5,84±0,72 <sup>ab</sup>	0,17±0,03 <sup>ab</sup>	6,47±0,44 <sup>abc</sup>
B2	0,95±0,17	4,99±0,05 <sup>a</sup>	0,14±0,01 <sup>a</sup>	5,93±0,04 <sup>a</sup>
D1	0,95±0,17	<b>6,23±0,64<sup>b</sup></b>	<b>0,19±0,02<sup>b</sup></b>	<b>6,71±0,36<sup>c</sup></b>
D2	0,95±0,17	6,10±0,51 <sup>b</sup>	0,18±0,02 <sup>b</sup>	6,63±0,30 <sup>b</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)

Ngoài ra, tỷ lệ sống của tôm ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết thảo dược dao động từ 81,31-88,38%. Trong đó, nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết bàng đạt tỷ lệ sống cao nhất (88,38%), thấp nhất ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết bàng. Tuy nhiên ở tất cả các nghiệm thức bổ sung chất chiết bàng (1%, 2%) và DHC (1%, 2%) đều có tỷ lệ sống không khác biệt có ý nghĩa thống kê (p>0,05) so với nghiệm thức đối chứng. Ngoài ra, hệ số tiêu tốn thức ăn (FCR) đạt giá trị thấp nhất ở nghiệm thức bổ sung 1%, 2% chất chiết DHC và 1% chất chiết bàng. Đặc biệt, FCR ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết điệp hạ châu thân đỏ thấp hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức 2% chất chiết bàng (p<0,05).

**Bảng 2: Trung bình tỷ lệ sống, FCR của tôm thẻ chân trắng sau 4 tuần nuôi**

Nghiệm thức	Tỷ lệ sống (%)	FCR
ĐC	86,36±6,60 <sup>a</sup>	1,21±0,01 <sup>bc</sup>
B1	<b>88,38±0,87<sup>a</sup></b>	<b>1,11±0,11<sup>ab</sup></b>
B2	81,31±2,31 <sup>a</sup>	1,36±0,04 <sup>c</sup>
D1	86,36±5,45 <sup>a</sup>	<b>1,05±0,12<sup>ab</sup></b>
D2	84,85±4,01 <sup>a</sup>	<b>0,95±0,15<sup>a</sup></b>

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)

Như vậy, tôm được bổ sung chất chiết DHC (1%) có tốc độ tăng trưởng khối lượng tương đối và hệ số tiêu tốn thức ăn ở nghiệm thức bổ sung 2% DHC khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nghiệm thức đối chứng. Thảo dược đã được chứng minh là chất kích thích tăng trưởng bằng khả năng tăng cường các enzyme tiêu hóa (protease, amylase và lipase), do đó thúc đẩy gia tăng tỷ lệ sống và kích thích tăng trưởng của tôm. Điều này dẫn đến việc tăng cường sử dụng thức ăn và cuối cùng là tạo ra tốc độ tăng trưởng tốt hơn (Radhakrishnan *et al.*, 2014). Tuy nhiên, nồng độ thảo dược quá cao cũng ảnh hưởng đến tăng trưởng và tỷ lệ sống của động vật thủy sản. Cụ thể, theo kết quả nghiên cứu của Ikhwannuddin *et al.* (2014), bổ sung chất chiết bàng

với nồng độ 3 mg/mL giúp gia tăng tỷ lệ sống và tăng cường tăng trưởng của hậu ấu trùng tôm sú, tuy nhiên nồng độ cao hơn trở nên độc và có thể gây chết hậu ấu trùng tôm sú. Hay một số thảo dược khác như bột lá đu đủ có chứa một loại enzyme papain giúp làm tăng khả năng tiêu hóa protein, cải thiện chỉ số FCR, SGR cho tôm sú (Penaflorida, 1995). Chiết xuất methanolic của các loại thảo dược (*Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* và *Psoralea corylifolia*) cũng được xác định giúp tăng tỷ lệ sống và SGR của tôm sú (Citarasu *et al.*, 2003). Qua đó, việc bổ sung chất chiết bàng (1%, 2%) và DHC (1%, 2%) không ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng cũng như tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng. Cũng như bổ sung DHC (1%, 2%) giúp tăng trưởng khối lượng tương đối và cải thiện hệ số tiêu tốn thức ăn.

Bên cạnh việc đánh giá tác động của chất chiết bàng và DHC đến tăng trưởng, nghiên cứu cũng đặc biệt quan tâm đến sự tác động của các chất chiết này đến khả năng đáp ứng miễn dịch không đặc hiệu của tôm thẻ chân trắng.

**3.2 Tác động của chế độ cho ăn bổ sung chất chiết bàng và điệp hạ châu thân đỏ lên lên chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng**

Tôm thẻ chân trắng của các nghiệm thức ăn thức ăn có bổ sung chất chiết bàng và DHC với nồng độ 1% và 2% đều có chỉ số tổng tế bào máu (THC) tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng. Cụ thể, sau 2 tuần bổ sung thảo dược, hàm lượng THC đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết bàng (19,73x10<sup>3</sup> tb/mm<sup>3</sup>), và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết bàng (17,79x10<sup>3</sup> tb/mm<sup>3</sup>); 1% chất chiết DHC (17,51x10<sup>3</sup> tb/mm<sup>3</sup>), 2% chất chiết DHC (16,92x10<sup>3</sup> tb/mm<sup>3</sup>) và nghiệm thức đối chứng (14,94x10<sup>3</sup> tb/mm<sup>3</sup>). Ở thời điểm thu mẫu tuần 4, chỉ số THC của nghiệm thức bổ sung chất chiết bàng (1%, 2%) và DHC (1%, 2%) cho kết quả cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với nghiệm thức đối chứng. Ngoài ra, THC của tôm ở nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết

bảng khác biệt có ý nghĩa thống kê so ( $p < 0,05$ ) với nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết bàng và 1%, 2% chất chiết điệp hạ châu thân đỏ (Bảng 3). Đồng thời, nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết bàng, 2% chất chiết bàng và 1% chất chiết điệp hạ châu thân đỏ có giá trị THC tăng lên và khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai thời điểm bổ sung thảo dược 2 tuần và 4 tuần ( $p < 0,05$ ).

Thêm vào đó, nghiên cứu cũng xác định sự biến động về hàm lượng từng loại bạch cầu (bạch cầu có hạt - GC, bạch cầu không hạt - HC) trên tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết bàng và DHC tại thời điểm 2 tuần và 4 tuần của thí nghiệm. Kết quả được trình bày ở Bảng 4, nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết bàng chỉ số GC cao nhất, khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức còn lại ở cả hai thời điểm khảo sát. Kết quả tương tự đối với chỉ số về hàm lượng bạch cầu

không hạt, đồng thời có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) ở 2 tuần và 4 tuần (Bảng 4).

**Bảng 3: Tổng tế bào máu (THC) ( $\times 10^3$  tb/mm<sup>3</sup>) của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung chất chiết bàng và điệp hạ châu thân đỏ thời điểm 2 tuần và 4 tuần của thí nghiệm**

Nghiệm thức	Thời điểm thu mẫu	
	2 tuần	4 tuần
ĐC	14,94±2,23 <sup>aA</sup>	15,87±1,90 <sup>aA</sup>
B1	<b>19,73±1,85<sup>cA</sup></b>	<b>22,89±1,78<sup>cB</sup></b>
B2	17,79±1,49 <sup>bA</sup>	19,87±1,87 <sup>bB</sup>
D1	17,51±1,77 <sup>bA</sup>	<b>20,04±1,81<sup>bB</sup></b>
D2	16,92±1,76 <sup>bA</sup>	18,54±1,78 <sup>bA</sup>

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

**Bảng 4: Tổng bạch cầu không hạt (HC), có hạt (GC) ( $\times 10^3$  tb/mm<sup>3</sup>) của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung chất chiết bàng và điệp hạ châu thân đỏ sau 2 tuần và 4 tuần**

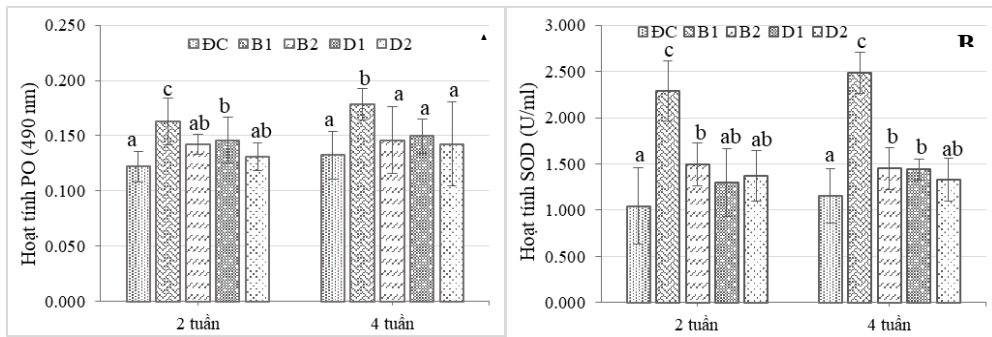
Nghiệm thức	Chỉ tiêu và thời điểm thu mẫu			
	GC		HC	
	2 tuần	4 tuần	2 tuần	4 tuần
ĐC	1,71±0,52 <sup>aA</sup>	1,72±0,33 <sup>aA</sup>	13,23±1,78 <sup>aA</sup>	14,14±1,65 <sup>aA</sup>
B1	<b>2,91±0,99<sup>cA</sup></b>	<b>3,65±0,45<sup>dA</sup></b>	<b>16,81±1,83<sup>cA</sup></b>	<b>19,25±1,55<sup>cB</sup></b>
B2	1,85±0,23 <sup>abA</sup>	2,3±0,46 <sup>bcB</sup>	15,95±1,34 <sup>bcA</sup>	17,57±1,84 <sup>bB</sup>
D1	2,35±0,5 <sup>bA</sup>	2,58±0,26 <sup>cdA</sup>	15,16±1,30 <sup>bA</sup>	17,46±1,77 <sup>bB</sup>
D2	1,92±0,29 <sup>abA</sup>	2,19±0,33 <sup>bA</sup>	15,01±1,59 <sup>bA</sup>	16,35±1,63 <sup>bA</sup>

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

Từ kết quả trên cho thấy việc bổ sung chất chiết bàng và DHC giúp gia tăng lượng tế bào máu cũng như từng loại bạch cầu ở tôm thẻ chân trắng sau 2 tuần và 4 tuần bổ sung. Trong đó, nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết bàng có giá trị cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với các nghiệm thức còn lại. 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 (Söderhäll and Cerenius, 1992).

Đối với hoạt tính PO ở thời điểm 2 tuần, nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết bàng có hoạt tính PO cao nhất kể đến là ở nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết

DHC. Tuy nhiên, hoạt tính PO ghi nhận ở nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết bàng khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng. Kết quả hoạt tính PO của tôm thẻ chân trắng ở giai đoạn 4 tuần cũng tương tự. Hình 1A cho thấy tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung 1% chất chiết bàng có hoạt tính PO cao nhất ở thời điểm 2 tuần và 4 tuần bổ sung. Hệ thống phenoloxidase (pro-PO) là một thành phần quan trọng trong hệ thống miễn 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 peptidoglycan,  $\beta$ -1,3-glucan, lipopolysaccharide và dẫn đến pro-PO chuyển thành PO, quá trình này được gọi là quá trình melanin hóa (Ashida and Yamazaki, 1990).



**Hình 1: Hoạt tính PO (490 nm), SOD (U/ml) của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung chất chiết bàng và điệp hạ châu thân đỏ**

Tôm thẻ chân trắng của các nghiệm thức ăn thức ăn có bổ sung chất chiết bàng và DHC (1% và 2%) đều có hoạt tính SOD cao hơn nghiệm thức đối chứng ở cả hai thời điểm thu mẫu. Trong đó, bổ sung chất chiết bàng (1%, 2%) có giá trị cao nhất và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng và nghiệm thức bổ sung chất chiết bàng (1%, 2%) cả hai thời điểm khảo sát. Kế đến nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết DHC không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng sau 2 tuần, nhưng lại khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) sau 4 tuần. Đối với nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết bàng khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng sau 4 tuần. Bên cạnh đó, khi so sánh giữa hai thời điểm khảo sát, thì ở thời điểm 4 tuần hoạt tính SOD gia tăng nhưng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với thời điểm 2 tuần ở tất cả các nghiệm thức (Hình 1B). Qua đó, có thể thấy việc bổ sung chất chiết thảo dược vào thức ăn giúp gia tăng hoạt tính SOD trong máu tôm thẻ chân trắng. Hoạt tính SOD được sinh ra nhằm cân bằng các gốc tự do trong cơ thể vật chủ. SOD là một trong những cơ chế đáp ứng miễn dịch chính chống lại các tác nhân gây hại đến cơ thể của giáp xác - tôm (Fridovich, 1995).

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. Theo Reverter *et al.* (2017) quá trình tác dụng của chất chiết thảo dược đến phản ứng miễn dịch, tăng cường

bảo vệ vật chủ chống lại tác nhân gây bệnh là phụ thuộc vào liều lượng chất chiết thảo dược, và thời gian mà vật chủ tiếp xúc với chất chiết thảo dược đó.

Nhìn chung, bổ sung chất chiết bàng và chất chiết DHC (1%, 2%) giúp tôm thẻ chân trắng gia tăng đáng kể và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) ở một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu (THC, GC, HC, PO và SOD) ở cả hai thời điểm khảo sát (2 và 4 tuần). Đồng thời, thí nghiệm tiếp tục thực hiện xác định khả năng kháng lại mầm bệnh của tôm thẻ chân trắng được cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết bàng và điệp hạ châu thân đỏ, bằng việc cảm nhiễm tôm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus*, tác nhân gây bệnh gan tụy cấp tính.

### 3.3 Khả năng đề kháng *V. parahaemolyticus* của tôm thẻ chân trắng được cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết bàng và điệp hạ châu thân đỏ

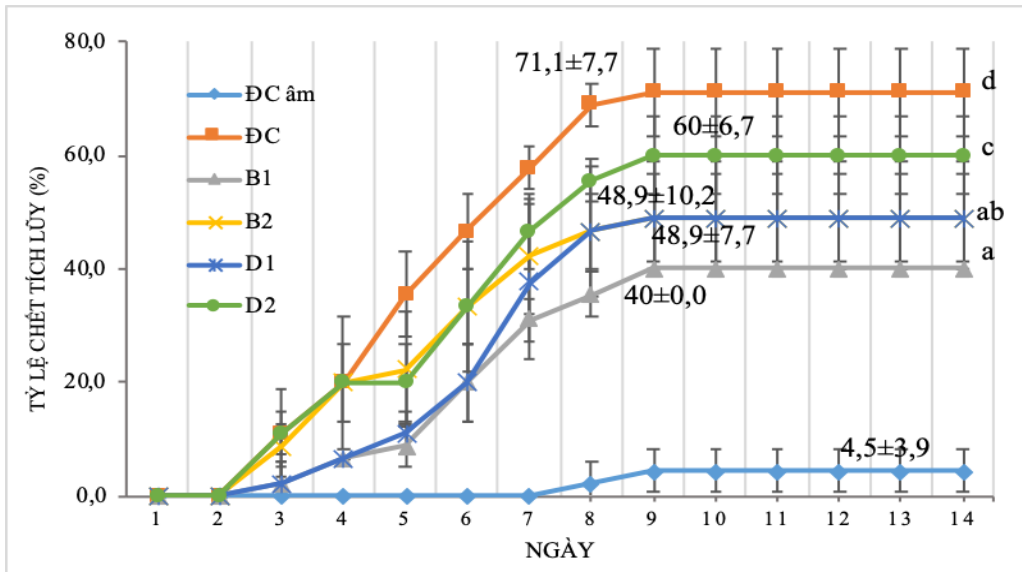
Tôm thẻ chân trắng sau khi cảm nhiễm được theo dõi và ghi nhận dấu hiệu bệnh lý, tỷ lệ chết trong 14 ngày cảm nhiễm. Thời điểm 1-2 ngày sau cảm nhiễm, tôm có dấu hiệu ít hoạt động, bơi lơ dờ, bỏ ăn, ruột rỗng. Vào các ngày tiếp theo, tôm thí nghiệm có các dấu hiệu của bệnh gan tụy cấp tính bao gồm gan tụy nhạt màu, teo và dai, vỏ mềm (Hình 1). Các dấu hiệu bệnh lý nêu trên tương tự với mô tả của Lightner *et al.* (2013).

Tôm bắt đầu chết vào ngày thứ 3 sau khi cảm nhiễm ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết bàng và DHC và cả nghiệm thức đối chứng. 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 9 cho đến khi kết thúc thí nghiệm (14 ngày).



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

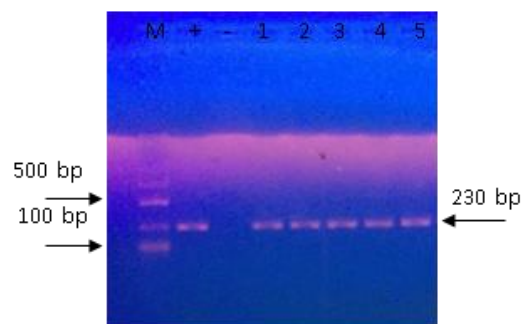
A: Tôm cảm nhiễm trong hệ thống bể kính; B: Tôm nhiễm bệnh nhạt màu ruột rỗng, gan tụy teo



**Hình 2: Tỷ lệ chết 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% chất chiết bàng có tỷ lệ chết thấp nhất với 40%, kế tiếp là nghiệm thức 2% chất chiết bàng và 1% chất chiết DHC với cùng 48,9%; tỷ lệ chết cao nhất ở nghiệm thức đối chứng (không bổ sung thảo dược, có cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*) với 71,1% (Hình 2). Tôm thí nghiệm ở các nghiệm thức được tái phân lập trên TCBS sau đó được chọn để kiểm tra PCR hai bước phát hiện vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* đều cho kết quả dương tính, sản phẩm khuếch đại thể hiện vạch sáng ở vị trí 230 bp (Hình 3). Thông qua kết quả PCR cho thấy tôm thẻ chân trắng của thí nghiệm chết là do tôm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.



**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, 2, 3, 4: Mẫu DNA của vi khuẩn phân lập tương ứng với nghiệm thức bổ sung 1, 2% chất chiết bàng và điệp hạ châu thân đỏ; Giếng 5: Mẫu DNA của vi khuẩn phân lập ở nghiệm thức đối chứng

Theo kết quả nghiên cứu của Chansue and Assawawongkasem (2008), chất chiết bằg ở nồng độ thấp có thể diệt được vi khuẩn *V. parahemolyticus*, có hoạt tính kháng nấm (Chitmanat *et al.*, 2005), giúp tăng cường tổng hồng cầu, bạch cầu, tế bào lympho và protein huyết thanh ở cá (Nugroho *et al.*, 2016). Ngoài ra, sử dụng lá, vỏ cây, hoa, trái của cây bằg giúp điều trị một số bệnh ở người như viêm gan, kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, chống viêm, bảo vệ gan (Anand *et al.*, 2015). Theo Anand *et al.* (2015), trong lá bằg có chứa 1-degalloyl-eugeniin, chebulagic acid, gentisic acid, corilagin, geraniin, granatin B, kaempferol, punicalagin, quercetin, tercatatin, tergalagin, terflavin A và terflavin B. Những điều này có thể lý giải chất chiết lá bằg giúp tôm thẻ chân trắng tăng cường miễn dịch và gia tăng tỷ lệ sống chống lại *V. parahemolyticus*, gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính.

Tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung chất chiết DHC có các thông số miễn dịch và tỷ lệ sống không cao hơn tôm thẻ chân trắng được bổ sung chất chiết bằg. Tuy nhiên, chế độ cho ăn bổ sung chất chiết điệp hạ châu thân đỏ giúp tôm thẻ chân trắng cải thiện được tốc độ tăng trưởng khối lượng tương đối (của nghiệm thức 1% chất chiết DHC) và giảm hệ số tiêu tốn thức ăn (của nghiệm thức 2% chất chiết DHC) mặc dù kết quả ghi nhận không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ) so với nghiệm thức bổ sung chất chiết bằg nhưng khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng. Trong DHC có các hợp chất kháng khuẩn, chống oxy hóa cao như flavonoid, phenolic, tanin và các hợp chất thuộc nhóm phyllanthin (Kumaran and Karunakaran, 2005). Theo Lai *et al.* (2008), chất chiết DHC có khả năng kháng một số loại vi khuẩn gây bệnh trên người, cụ thể chất chiết điệp hạ châu thân đỏ ngoài việc ức chế sự phát triển của vi khuẩn *Helicobacter pylori* (tác nhân gây ra vết loét dạ dày và ung thư dạ dày), thì chất chiết DHC còn có tác động đến biểu hiện gene kappa B (NF- $\kappa$ B), gen liên quan đến kích hoạt yếu tố hạt và sản xuất interleukin (IL)-8 trong tế bào AGS (adenocarcinoma gastric) ở biểu mô dạ dày của người nhiễm *H. pylori*. Do vậy, việc bổ sung DHC cũng có khả năng tác động đến hệ miễn dịch của vật chủ nhằm chống lại tác nhân gây bệnh.

Những kết quả ghi nhận ở trên cho thấy chất chiết bằg cũng như chất chiết điệp hạ châu thân đỏ rất có tiềm năng ứng dụng trong ngành nuôi tôm thẻ chân trắng.

## 4 KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

### 4.1 Kết luận

Bổ sung chất chiết bằg, điệp hạ châu thân đỏ ở nồng độ 1%, 2% sau 4 tuần không ảnh hưởng đến tốc độ tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng.

Bổ sung 1% chất chiết bằg trong 2 tuần và 4 tuần giúp tôm thẻ chân trắng tăng cường các chỉ tiêu miễn dịch (THC, GC, HC, PO và SOD) và chống lại *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính với tỷ lệ chết tích lũy 40% thấp hơn so với nhóm đối chứng (71,1%).

### 4.2 Đề xuất

Xác định nhịp bổ sung chất chiết bằg ở nồng độ 1% lên khả năng kháng bệnh vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* trên tôm thẻ chân trắng nhằm đánh giá hiệu quả kháng bệnh của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung chất chiết bằg ở các mức thời gian khác nhau.

## LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này đã được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản. Nhóm tác giả xin cảm ơn đến các em sinh viên ngành Bệnh học thủy sản khóa 42, khóa 43 Trường Đại học Cần Thơ đã cùng nhóm tác giả thực hiện thí nghiệm và phân tích mẫu vật.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anand, A.V., Divya N. and Punniya Kotti P., 2015. An updated review of *Terminalia catappa*. Pharmacognosy Reviews, 9(18): 93-98.
- Ashida, M. and Yamazaki, H.I., 1990. Biochemistry of the phenoloxidase system in insects with special reference to its activation. In: Ohnishi E. and Ishizaki H. (Eds.). Molt and Metamorphosis. Springer -Verlag, Berlin. 239-265pp.
- Boonyawiwat, V., Patanasatienkul T., Kasornchandra J. *et al.*, 2017. Impact of farm management on expression of early mortality syndrome/acute hepatopancreatic necrosis disease (EMS/AHPND) on penaeid shrimp farms in Thailand. Journal of Fish Diseases, 40(5): 649- 659.
- 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 Immunopathology, 126 (1-2): 9-19.
- Chansue, N. and Assawawongkasem N., 2008. The in vitro antibacterial activity and ornamental fish toxicity of the water extract of Indian almond



- leaves (*Terminalia catappa* Linn.). Khon Kaen University Veterinary Journal, 18(1): 36-45.
- Chitmanat, C., Tongdonmuan K. and Nunsong W., 2005 The use of crude extract from traditional medicinal plants to eliminate *Tricodina* sp. in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fingerlings. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 27(1): 359- 364.
- Citarasu, T., 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. Aquaculture International, 18(3): 403-414.
- Citarasu, T., Venkatramalingam, K., Babu, M.M., Sekar R.R.J. and 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(6): 581-595.
- 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.
- Dangtip, S., Sirikharin R., Sanguanrut P. *et al.*, 2015. AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. Aquaculture Reports, 2: 158–163.
- De La Peña, L.D., Cabillon N.A., Catedral D.D. *et al.*, 2015. Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) outbreaks in *Penaeus vannamei* and *P. monodon* cultured in the Philippines. Diseases of Aquatic Organisms, 116: 251–254.
- De Schryver, P., Defoirdt T., Sorgeloos P., 2014. Early mortality syndrome outbreaks: a microbial management issue in shrimp farming. Public Library of Science Pathogens, 10: 1003919.
- Dong, X., Wang H., Zou P. *et al.*, 2017. Complete genome sequence of *Vibrio campbellii* strain 20130629003S01 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease. Gut Pathogens, 9:31.
- FAO- Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2013. FAO/MARD Technical Workshop on Early Mortality Syndrome (EMS) or Acute Hepatopancreatic Necrosis Syndrome (AHPNS) of Cultured Shrimp, Hanoi, Vietnam, 25-27 June 2013. FAO Fisheries and Aquaculture Report. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 54 pp.
- 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.
- 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.
- Ikhwanuddin, M.H.D., Moh, J.H.Z., Manan Hidayah, Noor-Hidayati A.B., Aina-Lyana N.M.A. and Nor Juneta A.S., 2014. Effect of Indian almond, *Terminalia catappa* leaves water extract on the survival rate and growth performance of black tiger shrimp, *Penaeus monodon* post larvae. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation International Journal of the Bioflux Society, 7(2): 85-93.
- 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: 53–65.
- Kirubakaran, C.J.W., Alexander, C.P. and Michael, R.D., 2010. Enhancement of non-specific immune responses and disease resistance on oral administration of *Nyctanthes arbortristis* seed extract in *Oreochromis mossambicus* (Peters). Aquaculture Research, 41: 1630–1639.
- Kondo, H., Van, P.T., Dang, L.T. and Hirono, I., 2015. Draft genome sequences of non-*Vibrio parahaemolyticus* acute hepatopancreatic necrosis disease strain KC13.17.5, isolated from diseased shrimp in Vietnam. Genome Announc, 3: 00978-15.
- Kumaran, A. and Karunakaran, R.J., 2005. In vitro antioxidant activities of methanol extracts of five *Phyllanthus* species from India. Lebensmittel Wissenschaft and Technologie, 40: 344-352.
- Lai, C.H., Fang S.H., Rao Y.K. *et al.*, 2008. Inhibition of *Helicobacter pylori* induced inflammation in human gastric epithelial AGS cells by *Phyllanthus urinaria* extracts. Journal of Ethnopharmacology, 118(3): 522-526
- Le Moullac, G., Klein B., Sellos D. and Van Wormhoudt A., 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and  $\alpha$ -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 208(1-2): 107-125.
- Lightner, D.V., Redman C.R., Pantoja B.L., Noble L.M. and Loc Tran, 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.

- Loc, T., Nunan L., Redman R.M., Mohny L.L., Pantoja C.R., Fitzsimmons K. *et al.*, 2013. Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105: 45–55.
- Miranda, C.D. and Zemelman R., 2002. Antimicrobial multiresistance in bacteria isolated from freshwater Chilean salmon farms. *Science of the Total Environment*, 293(1-3): 207-218.
- Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007. Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Thành phố Hồ Chí Minh, 528 trang.
- Nugroho, R. A., Manurung H., Saraswati D., Ladescha D. and Nur F.M., 2016. The effects of *Terminalia catappa* L. leaves extract on the water quality properties, survival and blood profile of Ornamental fish (*Betta* sp.) Cultured. *Biosaintifika: Journal of Biology and Biology Education*, 8(2): 240-247.
- OIE-World Organisation for Animal Health, 2019. Acute hepatopancreatic necrosis disease.
- Penaflores, V.D., 1995. Effect of papaya leaf meal on the *Penaeus monodon* post larvae. *Israeli Journal Aquaculture Bamidgah*, 47(11): 25–33.
- Radhakrishnan, S., Saravana Bhavan P., Seenivasan C., Shanthi R., Poongodi R., 2014. Influence of medicinal herbs (*Alteranthera sessilis*, *Eclipta alba* and *Cissus quadrangularis*) on growth and biochemical parameters of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture International*, 22: 551–572.
- Restrepo, L., Bayot B., Arciniegas S. *et al.*, 2018. PirVP genes causing AHPND identified in a new *Vibrio* species (*Vibrio punensis*) within the commensal Orientalis clade. *Scientific Reports*, 8:13080.
- 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*, 223-261pp.
- Seyfried, E.E., Newton R.J., Rubert K.F., Pedersen J.A. and McMahon K.D., 2010. Occurrence of tetracycline resistance genes in aquaculture facilities with varying use of oxytetracycline. *Microbial Ecology*, 59(4): 799-807.
- Sivaram, V., Babu M.M., Immanuel G., Murugadass S., Citarasu T. and Marian M.P., 2004. Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*. 237: 9–20.
- Söderhäll, K., and Cerenius L., 1992. Crustacean immunity. *Annual Review of Fish Diseases*, 2: 3-23.
- Xiao, J., Liu L., Ke Y., *et al.*, 2017. Shrimp AHPND-causing plasmids encoding the PirAB toxins as mediated by pirAB-Tn903 are prevalent in various *Vibrio* species. *Scientific Reports*, 7: 42177–42177.
- Xiaosha, L., Zhou L., Shuling Y. and Yongjie W., 2020. Complete genome sequence analysis of the *Vibrio owensii* strain SH-14 isolated from shrimp with acute hepatopancreatic necrosis disease. *Archives of Microbiology*. DOI: 10.1007/s00203-020-01824-z.