



## SỬ DỤNG THỨC ĂN BỔ SUNG CHẤT CHIẾT LÁ LỰU (*Punica granatum*) PHÒNG BỆNH HOẠI TỬ GAN TỤY CẤP TÍNH TRÊN TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*)

Trần Thị Tuyết Hoa<sup>1\*</sup>, Hồng Mộng Huyền<sup>1</sup>, Lê Quốc Việt<sup>1</sup> và Nguyễn Trọng Tuấn<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Khoa Khoa học Tự nhiên, 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))

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 22/02/2021

Ngày nhận bài sửa: 26/03/2021

Ngày duyệt đăng: 01/06/2021

### Title:

Use of dietary pomegranate (*Punica granatum*) leaf extract for prevention of acute hepatopancreatic necrosis disease in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*)

### 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

### ABSTRACT

Acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND) is one of leading cause of mass mortality in cultured shrimp yearly, caused significant increases in antibiotic application in shrimp farming. To reduce the use of antibiotic in shrimp farming, the study was conducted to evaluate the effect of dietary supplementation of the extract from pomegranate (*Punica granatum*) leaves on growth performance, immunity index and resistance of AHPND in whiteleg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). The research was carried out in 4 weeks with different supplementations, including control treatment, 1% *P. granatum* and 2% *P. granatum*. Results showed that (i) dietary supplementation of pomegranate extract could increase the growth rate and innate immunity of whiteleg shrimp; (ii) dietary supplementation of 2% pomegranate extract could significantly increase survival rate of whiteleg shrimp after being challenged to *Vibrio parahaemolyticus*. The obtained results suggested potential applications of the pomegranate extract in commercial shrimp farming.

### TÓM TẮT

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính là một trong những nguyên nhân gây thất thoát sản lượng tôm nuôi hàng năm, dẫn đến gia tăng lượng kháng sinh dùng trong hệ thống nuôi tôm. Để giảm thiểu việc sử dụng kháng sinh trong nuôi tôm, nghiên cứu được thực hiện nhằm đánh giá ảnh hưởng của chế độ cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết lá lựu đến tăng trưởng, thông số miễn dịch và khả năng kháng bệnh hoại tử gan tụy cấp tính ở tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*). Thí nghiệm được thực hiện trong 4 tuần với chế độ bổ sung khác nhau, bao gồm nghiệm thức đối chứng, nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết lá lựu và nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu. Kết quả cho thấy (i) chế độ cho ăn bổ sung chất chiết lá lựu mức 2% giúp gia tăng tốc độ tăng trưởng ( $p > 0,05$ ), và một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu ở tôm thẻ chân trắng ( $p < 0,05$ ); (ii) chế độ cho ăn bổ sung chất chiết lá lựu (2%) giúp tăng tỷ lệ sống của tôm thẻ chân trắng khi cảm nhiễm với *Vibrio parahaemolyticus* ( $p < 0,05$ ). Kết quả đạt được của nghiên cứu cho thấy tiềm năng ứng dụng của chất chiết lá lựu trong phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp trong nuôi tôm thương phẩm.

### 1. GIỚI THIỆU

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 (Photorhabdus insect-related (Pir)), gây bệnh cho các loài tôm biển (Tran

et al., 2013; World Organisation for Animal Health [OIE], 2019). Điểm đáng lưu ý, hai gen độc tố được xác định nằm trên plasmid, có khả năng truyền cho các loại vi khuẩn khác như *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus* và vẫn duy trì độc lực gây chết tôm (Lee et al., 2015; Kondo et al., 2015). Các chủng vi khuẩn này tồn tại tự nhiên trong môi trường nước lợ mặn nên gây khó khăn trong việc phòng ngừa bệnh, dẫn đến việc sử dụng thuốc kháng sinh trong phòng và trị bệnh cho tôm nuôi là rất phổ biến. Kháng sinh mang lại hiệu quả tốt trong việc điều trị bệnh vi khuẩn trên tôm (Jayaprakas & Sambhu, 1996) tuy nhiên việc lạm dụng kháng sinh sẽ ảnh hưởng đến môi trường và chất lượng sản phẩm thủy sản (Sarter et al., 2007). Do đó, việc nghiên cứu biện pháp giúp tôm tăng cường sức đề kháng với mầm bệnh, phòng trị bệnh an toàn và thân thiện với môi trường nhằm đáp ứng cho nuôi trồng thủy sản bền vững là rất cần thiết (Abdul Kader Mydeen & Haniffa, 2011).

Hiện nay, nhiều nghiên cứu đã xác định hiệu quả của việc sử dụng chiết xuất thảo dược giúp tôm tăng cường hệ miễn dịch và ức chế vi khuẩn gây bệnh (Citarasu, 2010). Chiết xuất thảo dược được ghi nhận có hoạt tính kháng khuẩn cao, tăng cường hệ miễn dịch, ít ảnh hưởng đến môi trường và không gây hại cho con người (Ravikumar et al., 2010; Abdul Kader Mydeen & Haniffa, 2011). Do vậy, việc dịch chuyển từ các loại thuốc tổng hợp sang các loại thảo dược như một chất thay thế cho kháng sinh, kích thích tăng trưởng trong nghề nuôi thủy sản đang trở nên phổ biến, được chấp nhận do hiệu quả mang lại (Adedeji et al., 2008). Vi khuẩn được ghi nhận không có khả năng đề kháng với các nhóm hóa chất hóa học (phytochemical) có trong chiết xuất thực vật (Gupta et al., 2014). Tuy nhiên, chiết xuất thảo dược được đánh giá không thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt đối với các chủng vi khuẩn đa kháng thuốc kháng sinh (Singh et al., 2020).

Các nghiên cứu trước cũng đã ghi nhận chất chiết lá lựu được xác định có hoạt tính kháng khuẩn *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* với đường kính vòng kháng khuẩn lớn tương ứng với  $20,7 \pm 0,58$  mm và  $18,3 \pm 0,58$  mm (Trần Thị Tuyết Hoa và ctv., 2020). Bên cạnh đó, cá tra giống được tăng cường khả năng đáp ứng miễn dịch và kháng vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh gan thận mù sau 4 tuần sử dụng thức ăn có bổ sung chất chiết lá lựu (Bùi Thị Bích Hằng & Trần Thị Tuyết Hoa, 2020).

Do vậy, nghiên cứu ảnh hưởng của chế độ ăn bổ sung chất chiết lá lựu lên sinh trưởng và khả năng kháng bệnh của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus*

*vannamei*) được thực hiện nhằm xác định hiệu quả tăng cường sức khỏe trên đối tượng tôm biển của chất chiết lá lựu. Kết quả nghiên cứu cung cấp thông tin khoa học làm cơ sở cho việc sử dụng thảo dược rộng rãi trong hoạt động nuôi trồng thủy sản nhằm giảm thiểu việc sử dụng kháng sinh trong quản lý dịch bệnh thủy sản.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu nghiên cứu

Lá lựu sử dụng cho nghiên cứu được thu hái từ các tỉnh Cần Thơ và Hậu Giang của vùng Đồng Bằng sông Cửu Long.

Tôm thẻ chân trắng ( $0,95 \pm 0,17$ g/con) 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 lựu được thu hái vào lúc sáng sớm hoặc chiều mát rửa sạch, để ráo, sấy khô ở  $60^\circ\text{C}$  và xay nghiền thành bột (ẩm độ 3,33%). Chiết xuất thảo dược được thực hiện bằng kỹ thuật ngâm dầm trong methanol 99,5% trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng (Nguyễn Kim Phi Phụng, 2007). Dịch chiết methanol được cô quay để loại bỏ dung môi dưới áp suất 200-300 mmHg thu được cao tổng với hiệu suất thu hồi là 10,54%. Cao tổng sau thu được trữ ở  $4^\circ\text{C}$  cho các thí nghiệm tiếp theo.

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

**Chuẩn bị thức ăn:** chất chiết lá lựu được áo ngoài viên thức ăn (Grobest, độ đậm 39%) với nồng độ 1% (10 g/kg thức ăn), 2% (20 g/kg thức ăn), 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  $4^\circ\text{C}$ .

**Bố trí thí nghiệm:** thí nghiệm được bố trí với 3 nghiệm thức và 3 lần lặp lại cho mỗi nghiệm thức, bao gồm: Nghiệm thức đối chứng (ĐC): tôm ăn thức ăn không bổ sung thảo dược; Nghiệm thức C1: tôm

ăn thức ăn bổ sung 1% chất chiết lá lựu; Nghiệm thức C2: tôm ăn thức ăn bổ sung 2% chất chiết lá lựu.

Tôm được nuôi trong bể composite 0,5 m<sup>3</sup> chứa 400 L nước có độ mặn 15‰, với mật độ 40 con/bể (tương ứng với 100 con/m<sup>2</sup>). Tôm thí nghiệm được cho ăn thức ăn có bổ sung thảo dược liên tục trong 4 tuần, cho ăn 4 lần/ngày với lượng thức ăn theo nhu cầu của tôm.

### Các chỉ tiêu theo dõi của thí nghiệm:

Chỉ tiêu môi trường bao gồm: oxy, nhiệt độ, pH được kiểm tra và ghi nhận hàng ngày bằng máy (Hanna HI9125); chỉ tiêu NH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub> được kiểm tra và ghi nhận hàng tuần bằng bộ test Sera.

Tốc độ tăng trưởng và tỷ lệ sống của tôm sau khi kết thúc thí nghiệm được ghi nhận vào tuần 4 (ngày 28) của thí nghiệm. Các chỉ tiêu tăng trưởng được xác định bao gồm: tốc độ tăng trưởng tuyệt đối DWG (g/ngày) = (Wf - Wi) / 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 / (Wf - Wi)]. Trong đó: Wf là trọng lượng cuối cùng, Wi là trọng 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) x 100.

Tôm (9 tôm/nghiệm thức) được thu mẫu để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch vào tuần 2 (ngày 14) và tuần 4 (ngày 28) 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 & Stewart, 1978), (iii) hoạt tính phenoloxidase (PO) (Hernández-Lospez et al., 1996), (iv) hoạt tính superoxide dismutase (SOD) (Beauchamp & Fridovich, 1971).

#### 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 lá lựu

Sau 4 tuần thí nghiệm bổ sung chất chiết lá lựu, tôm được gây 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% (1,9x10<sup>7</sup> CFU/mL).

Thí nghiệm cảm nhiễm được thực hiện trong bể kính (thể tích 100 L) bao gồm 4 nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần. Trong đó, ở nghiệm thức

đối chứng âm (ĐC âm) tôm ăn thức ăn không bổ sung chất chiết lá lựu và không cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*; ở nghiệm thức đối chứng dương (ĐC dương) tôm ăn thức ăn không bổ sung chất chiết lá lựu và cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*; ở nghiệm thức C1 tôm ăn thức ăn bổ sung 1% chất chiết lá lựu và cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*; ở nghiệm thức C2 tôm ăn thức ăn bổ sung 2% chất chiết lá lựu và cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*.

Sau khi gây cảm nhiễm, tôm tiếp tục ăn thức ăn tương ứng với từng nghiệm thức, và cho ăn theo nhu cầu. Tôm được theo dõi ghi nhận dấu hiệu bệnh lý và tỷ lệ chết trong vòng 14 ngày. 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) x 100

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 giá trị trung bình của các nghiệm thức.

## 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1. Tốc độ tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng được ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá lựu

Tốc độ tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng được xác định sau 4 tuần ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá lựu (ở các nồng độ 1% và 2%). Sau 4 tuần, khối lượng tôm ở các nghiệm thức có bổ sung chất chiết lá lựu (1% - 5,36 g/con và 2% - 6,08 g/con) cao hơn nghiệm thức đối chứng, sử dụng thức ăn không bổ sung thảo dược (5,21 g/con). Tương tự, tốc độ tăng trưởng tuyệt đối (DWG) và tốc độ tăng trưởng đặc biệt (SGR) của tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức có bổ sung chất chiết lá lựu (1% và 2%) cũng cao hơn nghiệm thức đối chứng - không bổ sung thảo dược (Bảng 1). Trong đó, nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu có khối lượng tôm, tốc độ tăng trưởng tuyệt đối và tốc độ tăng trưởng đặc biệt đạt giá trị cao nhất so với các nghiệm thức khác của thí nghiệm. Tuy nhiên, sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê (p<0,05).

**Bảng 1. Tốc độ tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng sau 4 tuần ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá lựu**

Nghiệm thức	W <sub>i</sub> (g)	W <sub>f</sub> (g)	DWG (g/ngày)	SGR <sub>w</sub> (%/ngày)	Tỷ lệ sống (%)	FCR
ĐC	0,95±0,17	5,21±0,45 <sup>a</sup>	0,15±0,02 <sup>a</sup>	6,07±0,32 <sup>a</sup>	86,36±6,60 <sup>ab</sup>	1,21±0,01 <sup>ab</sup>
C1	0,95±0,17	5,36±0,36 <sup>a</sup>	0,16±0,01 <sup>a</sup>	6,17±0,24 <sup>a</sup>	89,90±3,49 <sup>b</sup>	1,15±0,08 <sup>a</sup>
C2	0,95±0,17	6,08±0,69 <sup>a</sup>	0,19±0,03 <sup>a</sup>	6,62±0,41 <sup>a</sup>	81,31±3,49 <sup>a</sup>	1,17±0,18 <sup>a</sup>

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

Hệ số tiêu tốn thức ăn (FCR) ở nghiệm thức bổ sung 1% (FCR = 1,15), 2% (FCR = 1,17) chất chiết lá lựu đạt giá trị thấp hơn nghiệm thức đối chứng (FCR = 1,21). Ngoài ra, tôm ở nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết lá lựu đạt tỷ lệ sống cao nhất (89,90%). Tuy nhiên, nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu cho tỷ lệ sống thấp hơn nghiệm thức đối chứng, nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p>0,05). Nguyên nhân có thể là do nồng độ bổ sung thảo dược chưa phù hợp có thể gây ức chế sự tăng trưởng của động vật thủy sản. Putra et al. (2013) ghi nhận nhóm cá mú (*Epinephelus coioides*) có chế độ ăn bổ sung 1% chiết xuất rau ngót (*Sauropus androgynous*) đạt tốc độ tăng trưởng tốt và tỷ lệ chuyển hóa thức ăn thấp so với nhóm cá mú bổ sung chiết xuất rau ngót ở nồng độ cao (2,5% và 5% chiết xuất rau ngót).

Trong thời gian thí nghiệm các yếu tố môi trường gồm pH, hàm lượng oxy hòa tan được duy trì ở mức thích hợp cho sự sinh trưởng bình thường của tôm nuôi. Trong đó, nhiệt độ sáng chiều dao động trong khoảng 27,5- 31,5°C, pH ở mức 8, hàm lượng DO trung bình khoảng 4,36 mg/L, hàm lượng NH<sub>4</sub> trung bình khoảng 0,13 mg/L. Nhìn chung, các yếu tố môi trường được quản lý tốt và không gây ảnh hưởng đến sự sinh trưởng tôm trong suốt thời gian thí nghiệm.

Như vậy, tôm được cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá lựu (1% và 2%) đạt tốc độ tăng trưởng tốt hơn so với tôm ở nghiệm thức đối chứng, không bổ sung chất chiết lá lựu. Các loại thảo dược được ghi nhận có khả năng tạo hương vị, kích thích bắt mồi, tiết dịch tiêu hóa và giúp hấp thu thức ăn hiệu quả hơn. Qua đó, chiết xuất thảo dược giúp cải thiện khả năng tiêu hóa, gia tăng sự chuyển đổi thức ăn và dẫn đến việc tổng hợp protein cao hơn (Lee & Gao, 2012). Một số sản phẩm thảo dược được chiết xuất từ cây kỳ nhâm, gừng, cà gai bạc thùy, xuyên tâm liên, phá cố chỉ, cỏ mực, hương nhu, cây *Picrorrhiza* (thuộc họ hoa mõm sói), diệp hạ châu, dây thần thông,... đều có tác động tích cực đến tôm như khả năng thúc đẩy giảm stress, giúp tiêu hóa tốt và do vậy tăng trưởng tốt hơn (Citarasu et al., 1998; Citarasu et al., 2003).

**3.2. Tác động của chế độ cho ăn bổ sung chất chiết lá lựu 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 lá lựu ở các nồng độ 1% và 2% đều có chỉ số tổng tế bào máu (THC) tăng cao hơn nghiệm thức đối chứng. Trong đó, hàm lượng THC đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu ở cả hai thời điểm khảo sát, ngày 14 và ngày 28 của thí nghiệm. Sự khác biệt này có ý nghĩa thống kê (p<0,05) so với nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết lá lựu và nghiệm thức đối chứng (Bảng 2). So sánh 2 thời điểm thu mẫu cho thấy giá trị THC ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu tăng cao sau 28 ngày bổ sung và có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (p<0,05) (Bảng 2).

**Bảng 2. Chỉ số huyết học (x10<sup>3</sup> tb/mm<sup>3</sup>) của tôm thẻ chân trắng ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá lựu ở các thời điểm ngày 14 và ngày 28 của thí nghiệm**

Chỉ số	Thời điểm thu mẫu	
	Ngày 14	Ngày 28
Tổng tế bào máu		
ĐC	14,94±2,23 <sup>aA</sup>	15,87±1,90 <sup>aA</sup>
C1	15,29±2,01 <sup>aA</sup>	16,58±1,74 <sup>aA</sup>
C2	19,44±1,39 <sup>bA</sup>	21,96±2,15 <sup>bB</sup>
Bạch cầu hạt		
ĐC	1,71±0,52 <sup>aA</sup>	1,72±0,32 <sup>aA</sup>
C1	1,66±0,38 <sup>aA</sup>	1,92±0,24 <sup>abA</sup>
C2	2,90±0,44 <sup>bA</sup>	3,51±0,33 <sup>cB</sup>
Bạch cầu không hạt		
ĐC	13,23±1,78 <sup>aA</sup>	14,14±1,65 <sup>aA</sup>
C1	13,63±1,76 <sup>abA</sup>	14,66±1,60 <sup>aA</sup>
C2	16,54±1,05 <sup>cA</sup>	18,45±2,05 <sup>bB</sup>

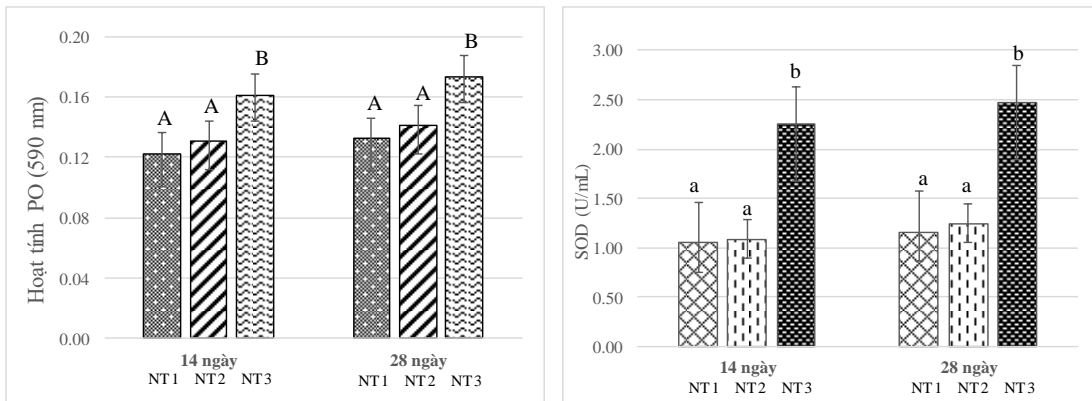
Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột mang mẫu tự (a,b,c) giống nhau, các giá trị trên cùng một dòng mang mẫu tự (A,B) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê (p>0,05)

Tương tự, chỉ tiêu bạch cầu hạt (Granular cell - GC) đạt giá trị cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu, tiếp theo là nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết lá lựu và nghiệm thức đối chứng. So sánh 2 thời điểm thu mẫu ngày 14 và ngày 28 cho

thấy giá trị GC có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu ( $p < 0,05$ ) (Bảng 2).

Ở thời điểm 14 ngày, chỉ tiêu bạch cầu không hạt (Hyaline cell - HC) cũng đạt giá trị cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu với mật độ là  $16,54 \times 10^3$  tb/mm<sup>3</sup> khác biệt có ý nghĩa thống kê với các nghiệm thức còn lại ( $p < 0,05$ ). Tương tự,

ở thời điểm 28 ngày bổ sung giá trị HC đạt cao nhất ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu ( $18,45 \times 10^3$  tb/mm<sup>3</sup>) và thấp nhất ở NT đối chứng với mật độ là  $14,14 \times 10^3$  tb/mm<sup>3</sup>. So sánh ở 2 thời điểm thu mẫu, kết quả ghi nhận chỉ số HC của nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu ( $18,45 \times 10^3$  tb/mm<sup>3</sup>) ở thời điểm 28 ngày bổ sung ghi nhận giá trị cao hơn và khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại ở thời điểm 14 ngày ( $p < 0,05$ ) (Bảng 2).



**Hình 1. Hoạt tính PO (490 nm), SOD (U/ml) của tôm thẻ chân trắng thời điểm 14 ngày và 28 ngày ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá lựu**

Các giá trị trong cùng một đợt có mẫu tự (A, B, a, b) giống nhau thể hiện sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ )

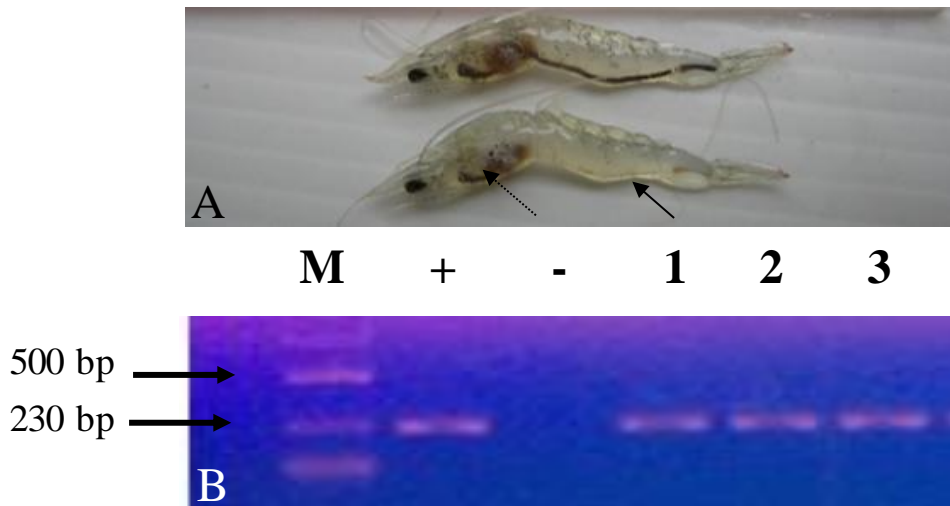
Tôm thẻ chân trắng của các nghiệm thức ăn thức ăn có bổ sung chất chiết lá lựu (1% và 2%) đều có hoạt tính enzyme phenoloxidase (PO) và superoxide dismutase (SOD) cao hơn nghiệm thức đối chứng ở cả hai thời điểm thu mẫu (Hình 1). Trong đó, nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu có giá trị cao nhất và khác biệt có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng cả hai thời điểm khảo sát. Như vậy, việc bổ sung chất chiết thảo dược vào thức ăn giúp gia tăng hoạt tính enzyme PO và SOD trong máu tôm, giúp tăng cường hệ miễn dịch của tôm thẻ chân trắng. SOD là enzyme được tạo ra từ cơ chế đáp ứng miễn dịch kháng lại các tác nhân gây hại đến cơ thể giáp xác – tôm (Campa-Cordova et al., 2002). Reverter et al. (2017) ghi nhận 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 và thời gian mà vật chủ tiếp xúc với chất chiết thảo dược. Kết quả phân tích hoạt tính PO và SOD cho thấy việc bổ sung chất chiết lá lựu mức 2% giúp gia tăng hoạt tính PO và SOD, tăng cường cơ chế đáp ứng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng.

Kết quả nghiên cứu cho thấy việc bổ sung chất chiết lá lựu vào chế độ ăn của tôm thẻ chân trắng

giúp gia tăng các chỉ số huyết học (tổng tế bào máu, bạch cầu hạt và bạch cầu đơn nhân) và các chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu (PO và SOD).

### 3.3. Khả năng đề kháng V. parahaemolyticus của tôm thẻ chân trắng được cho ăn thức ăn bổ sung chất chiết lá lựu

Tôm thẻ chân trắng được cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết lá lựu trong vòng 28 ngày, được cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* bằng phương pháp ngâm. Kết quả ghi nhận nghiệm thức đối chứng âm (tôm không cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus*) có tỷ lệ chết tích lũy là 4,5%. Nguyên nhân là do tôm có hiện tượng ăn nhau khi lột xác và kết quả kiểm tra cho thấy tôm chết ở nghiệm thức này không nhiễm khuẩn *V. parahaemolyticus*. Tôm ở các nghiệm thức cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* (NT ĐC dương; NT C1; NT C2) xuất hiện tôm chết sau 48 giờ cảm nhiễm. Tôm chết có dấu hiệu khối gan tụy nhợt nhạt, ruột rỗng không chứa thức ăn (Hình 2A). Tỷ lệ chết tăng dần vào những ngày tiếp theo cho tới ngày thứ 9 sau cảm nhiễm thì tôm ngừng chết.

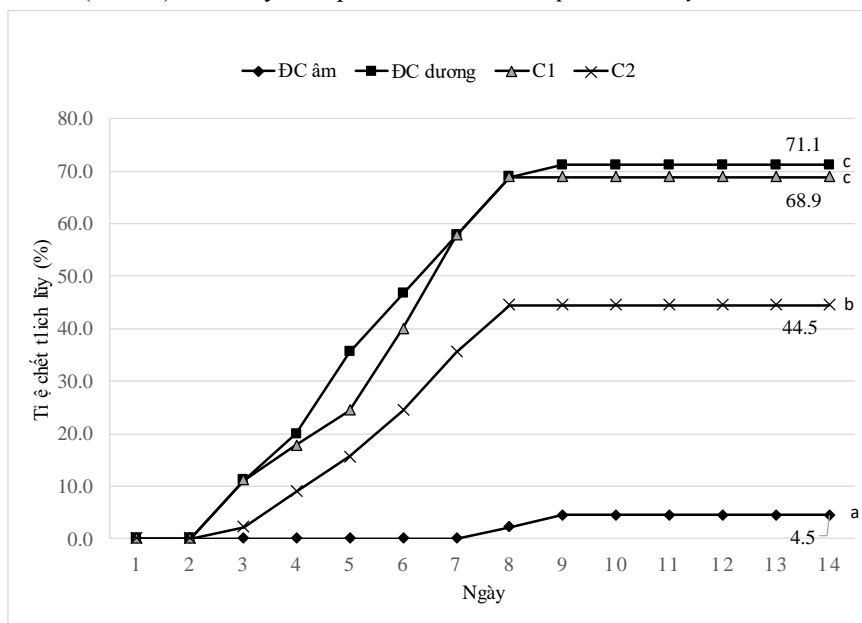


**Hình 2. Tôm thẻ chân trắng thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp**

A: Tôm nhiễm bệnh nhạt màu ruột rộng, gan tụy teo (mũi tên); B: 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, Mẫu DNA của vi khuẩn phân lập tương ứng với nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất chiết lá lựu, bổ sung 1%, 2% chất chiết lá lựu

Trong đó, nghiệm thức tôm sử dụng thức ăn không bổ sung chất chiết lá lựu (NT đối chứng dương) có tỷ lệ chết tích lũy là 71,1%, NT C1 (tôm sử dụng thức ăn bổ sung 1% chất chiết lá lựu) tỷ lệ chết tích lũy là 68,89%, NT C2 (tôm sử dụng thức ăn bổ sung 2% chất chiết lá lựu) có tỷ lệ chết tích lũy thấp nhất 44,4% (Hình 3). Như vậy, kết quả cho

thấy nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết lá lựu có hiệu quả cao nhất, với tỷ lệ chết tích lũy (44,4%) khác biệt có ý nghĩa ( $p < 0,05$ ) so với nghiệm thức đối chứng (71,1%). Điều này cho thấy việc bổ sung chất chiết lá lựu ở mức phù hợp có khả năng giúp tôm kháng lại tác nhân gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, *V. parahaemolyticus*.



**Hình 3. Tỷ lệ chết của tôm thẻ chân trắng sau 14 ngày cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus***

Tôm thẻ chân trắng ở các nghiệm thức cảm nhiễm với *V. parahaemolyticus* đều cho sản phẩm khuếch đại thể hiện vạch sáng ở vị trí 230 bp (Hình 2B). Kết quả PCR cho thấy tôm thẻ chân trắng của thí nghiệm chết là do tôm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*.

Chế độ cho ăn có bổ sung chất chiết xuất từ thảo dược cũng đã được xác định giúp tăng sức đề kháng với mầm bệnh trên tôm sú (*Penaeus monodon*). Cụ thể, tôm sú được cho ăn thức ăn có chứa chiết xuất mảnh cộng (*Clinacanthus nutans*) có tỷ lệ chết giảm (33,3% ở nhóm bổ sung 0,1% chiết xuất) so với nhóm đối chứng (75,5%) (Direkbusarakom et al., 1996). Tương tự, chiết xuất methanol của một số thảo dược như tai tượng xanh (*Acalypha indica*), cỏ gà (*Cynodon dactylon*), hồ hoàng liên (*Picrorrhiza kurroa*), sâm Ấn độ (*Withania somnifera*) và hương thảo (*Zosmarinus officinalis*) kết hợp bổ sung trong chế độ ăn của tôm trong 60 ngày, có khả năng kích thích miễn dịch và bảo vệ tôm khỏi bệnh đốm trắng (Yogeeswaran et al., 2012).

Các hợp chất alkaloids, glycosides, polyphenols, và terpenes chiết xuất từ thực vật đã được xác định có khả năng kháng khuẩn (Ahn, 2017). Các bộ phận khác nhau của cây lựu được xác định chứa nhiều loại hoạt chất sinh học. Trong đó, vỏ và rễ chứa tannin, alkaloid và polyphenol, các hợp chất này có hoạt tính kháng khuẩn mạnh (Ahmad & Beg, 2001; Naz et al., 2007); hạt lựu có chứa steroid; bột quả chứa vitamin, khoáng chất, chất béo, protein và carbohydrate (Lama et al., 2001). Chất chiết lựu được ghi nhận có khả năng kháng nhiều tác nhân gây bệnh bao gồm: vi khuẩn gram dương (*Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*...), vi khuẩn gram âm (*Vibrio parahaemolyticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella enterica*,...) và cũng có hiệu quả kháng nấm (*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*,...) (Sajjad et al., 2015). Kết quả nghiên cứu cho thấy việc bổ sung chất chiết lá lựu vào chế độ cho ăn của tôm thẻ chân trắng ở mức bổ sung phù hợp (2%) giúp nâng cao sức đề kháng của tôm đối với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp.

#### 4. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Chế độ cho ăn có bổ sung 2% chất chiết lá lựu sau 4 tuần giúp cải thiện tốc độ tăng trưởng của tôm thẻ chân trắng và tăng cường miễn dịch ở tôm thẻ chân trắng (gia tăng chỉ số huyết học và một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu- hoạt tính PO và SOD). Ngoài ra, chế độ cho ăn có bổ sung 2% chất chiết lá lựu giúp tăng tỷ lệ sống của tôm thẻ chân

trắng khi cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp (*V. parahaemolyticus*).

Đề nghị tiếp tục thực hiện thí nghiệm khảo sát chu kỳ bổ sung chất chiết lá lựu vào thức ăn để tìm hiểu khả năng ứng dụng trong thực tế.

#### 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.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdul Kader Mydeen, K. P., & Haniffa, M. A. (2011). Evaluation of antibacterial activity of medicinal plants on fish pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Research in Biology*, 1, 1-5.
- Adedeji, O. S., Farinu, G. O., Olayemi, T. B., Ameen, S.A. & Babatunde, G.M. (2008). The use of bitter kola (*Garcinia kola*) dry seed powder as a natural growth promoting agent in broiler chicks. *Research Journal of Poultry Sciences*, 2(4): 78-81.
- Ahmad, I., & Beg, A. Z. (2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacol*, 74(2), 113-133.
- Ahn, K. (2017). The worldwide trend of using botanical drugs and strategies for developing global drugs. *BMB Reports*, 50(3), 111-116.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Bùi Thị Bích Hằng và Trần Thị Tuyết Hoa, 2020. Ảnh hưởng của chất chiết lựu (*Punica granatum*) lên tăng trưởng và đáp ứng miễn dịch của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56 (Số chuyên đề: Thủy sản) (1), 161-169.
- Campa-Córdova, A. I., Hernández-saavedra, N. I., Philippis, R. de & Ascencio, F. (2002). Generation of superoxide anion and SOD activity in haemocytes and muscle of American white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) as a response to  $\beta$ -glucan and sulphated polysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology*, 12(4), 353-366
- Citarasu, T., Immanuel, G., & Marian, M. P. (1998). Effects of feeding Artemia enriched with stresstol and cod liver oil on growth and stress resistance in the Indian white shrimp *Penaeus indicus* post larvae. *Asian Fish Sciences*, 12, 65-75.
- 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.
- Citarasu, T. (2010). Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3), 403-414.
- Cornick, J. W., & 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., Thitamadee, S., Sritunyulucksana, K., Taengchaiyaphum, S., Mavichak, R., Proespraiwong, P. & Flegel, T.W. (2015). AP4 method for two-tube nested PCR detection of AHPND isolates of *Vibrio parahaemolyticus*. *Aquaculture reports*, 2, 158-162.
- Direkbusarakom, S., Herunsalee, A., Yoshimizu, M., & Ezura, Y. (1996). Protective efficacy of *Clinacanthus nutans* on yellow-head disease in black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Fish Pathology*, 33, 404-410.
- Gupta, P. D., Daswani, P. G., & Birdi, T. J. (2014). Approaches in fostering quality parameters for medicinal botanicals in the Indian context. *Indian Journal of Pharmacology*, 46 (4), 363-371.
- Hernández-López, J., Gollas-Galván, T., & Vargas-Albores F. (1996). Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp *Penaeus californiensis* Holmes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 113(1), 61-66.
- Kondo, H., Van, P. T., Dang, L. T., & 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 Announcements*, 3(5), 00978-15.
- Lama, Y. C., Ghimire, S. K., & Thomas, Y. A. (2001). Medicinal plants of dolpo: Amchis' knowledge and conservation. WWF Nepal Program, Kathmandu. ISBN: 99933-94-01-7
- Le Moullac, G., Klein B., Sellos, D., & 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.
- Lee, C. T., Chen, I. T., Yang, Y. T., Ko, T. P., Huang, Y. T., Huang, J. Y., Huang, M. F., Lin, S. J., Chen, C.Y., Lin, S. S., Lightner, D. V., Wang, A. H., Wang, H. C., Hor, L. I. & Lo, C. F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(34), 10798-10803.
- Lee, J. Y. & Gao, Y. (2012). Review of the application of garlic, *Allium sativum*, in aquaculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 43(4), 447-458.
- Naz, S., Siddiqi, R., Ahmad, S., Rasool, S. A. & Sayeed, S. A. (2007). Antibacterial activity directed isolation of compounds from *Punica granatum*. *Journal of Food Science*, 72(9), M341-M345.
- 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.
- OIE-World Organisation for Animal Health, 2019. Acute hepatopancreatic necrosis disease. Retrieved May 25, 2021, from <https://www.oie.int/en/home>
- Putra, A., Santoso, U., Lee, M. C., & Nan, F. H. (2013). Effects of dietary katuk leaf extract on growth performance, feeding behavior and water quality of grouper *Epinephelus coioides*. *Aceh International Journal of Science and Technology*, 2(1), 17-25.
- Ravikumar, S., Selvan, G. P. & Gracelin, N. A. A. (2010). Antimicrobial activity of medicinal plants along Kanyakumari Coast, Tamil Nadu. *African Journal of Basic & Applied Sciences*, 2(5-6), 153-157.
- Reverter, M., Tapissier-Bontemps, N., Sasal, P. & 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.
- Sajjad, W., Sohail, M., Ali, B., Din, G.U., Hayat, M., Imran Khan, Manzoor Ahmad & Suliman Khan (2015). Antibacterial activity of *Punica granatum* peel extract. *Mycopath*, 13(2), 105-111.
- Sarter, S., Kha, N. H. N., Hung, L. T., Lazard, J. & Didier, Montet. (2007). Antibiotic resistance in Gram-negative bacteria isolated from farmed catfish. *Food Control*, 18(11), 1391-1396.
- Singh, B. R., Yadav, A., Sinha, D. K., & Kumar, O. R. V. (2020). Potential of herbal antibacterials as an alternative to antibiotics for multiple drug resistant bacteria: an analysis. *Research in Veterinary Science*, 13(1), 1-9.
- Trần Thị Tuyết Hoa, Trần Thị Mỹ Duyên, Hồng Mộng Huyền, Bùi Thị Bích Hằng & Nguyễn Trọng Tuấn, 2020. Hoạt tính kháng khuẩn của một số chất chiết thảo dược kháng *Vibrio parahaemolyticus* và *Vibrio harveyi* gây bệnh ở tôm biển. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 56(số chuyên đề Thủy sản 1): 170-178.



Tran, L., Nunan, L., Redman, R. M., Mohny, L. L., Pantoja, C. R., Fitzsimmons, K., & Lightner, D. V. (2013). Determination of the infectious nature of the agent of acute hepatopancreatic necrosis syndrome affecting penaeid shrimp. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105(1), 45-55.

Jayaprakas, V. & Sambhu, C. (1996). Growth response of white prawn, *Penaeus indicus*, to dietary L-carnitine. *Asian Fisheries Science*, 9, 209-220.

Yogeeswaran, A., Velmurugan, S., Punitha, S. M. J., Babu, M. M., Selvaraj, T., Kumaran, T., & Citarasu, T. (2012). Protection of *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus by inactivated vaccine with herbal immunostimulants. *Fish & Shellfish Immunology*, 32(6), 1058-1067.