

DOI:10.22144/ctu.jvn.2020.064

ẢNH HƯỞNG CỦA β -GLUCAN LÊN ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH TỰ NHIÊN CỦA TÔM THẺ CHÂN TRẮNG (*Litopenaeus vannamei*) CẢM NHIỄM *Vibrio parahaemolyticus*

Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh*

Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Đặng Thị Hoàng Oanh (email: dthoanh@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 02/01/2020

Ngày nhận bài sửa: 27/02/2020

Ngày duyệt đăng: 29/06/2020

Title:

Effect of β -glucan on immune responses of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with *Vibrio parahaemolyticus*

Từ khóa:

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính, β -glucan, tôm thẻ chân trắng, *Vibrio parahaemolyticus*

Keywords:

Acute hepatopancreatic necrosis disease, β -glucan, *Litopenaeus vannamei*, *Vibrio parahaemolyticus*

ABSTRACT

The study was conducted to evaluate effects of dietary β -glucan supplementation on immune parameters and susceptibility of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*) to acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). White leg shrimps (1.8 ± 0.51 g/shrimp) were randomly distributed in 15 plastic tanks (30 shrimp/tank) with five treatments (TM) (in triplicate): (TM1) unchallenged control and no β -glucan supplementary feeding; (TM2) unchallenged and β -glucan supplementary feeding; (TM3) challenged control and no β -glucan supplementary feeding; (TM4) challenged and β -glucan supplementary feeding β -glucan for 7 days before challenge, and (TM5) challenged and β -glucan supplementary feeding (7 days before challenge and 7 days after challenge). After 14 days of post challenge, shrimp in TM3 had significantly higher cumulative mortality ($46.7 \pm 1.9\%$) ($P < 0.05$) in comparison to cumulative mortalities in TM1, TM2, TM4, and TM5. There was no significant difference between TM4 and TM5 ($P > 0.05$), and cumulative mortalities of these treatments were significantly different compared to TM1 and TM2 ($P < 0.05$). Histological examination indicated that hepatopancreas of challenged shrimp displayed typical pathological signs of AHPND shrimp. There were significant differences in total hemocyte count, phenoloxidase activity, and respiratory bursts among β -glucan supplemented and non-supplemented groups.

TÓM TẮT

Thí nghiệm được tiến hành để đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung β -glucan vào thức ăn đến các chỉ tiêu miễn dịch và tính miễn cảm của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) với bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND). Tôm thẻ chân trắng có trọng lượng trung bình $1,8 \pm 0,51$ g/con được bố trí ngẫu nhiên trong 15 bể nhựa (30 con/bể) với 5 nghiệm thức (NT), mỗi nghiệm thức lặp lại 3 lần, gồm: (NT1) không cảm nhiễm và không cho ăn bổ sung β -glucan; (NT2) không cảm nhiễm và cho ăn bổ sung β -glucan; (NT3) cảm nhiễm và không cho ăn bổ sung β -glucan; (NT4) cảm nhiễm và cho ăn bổ sung β -glucan (7 ngày trước cảm nhiễm) và (NT5) cảm nhiễm và cho ăn bổ sung β -glucan (7 ngày trước cảm nhiễm và 7 ngày sau cảm nhiễm). Sau 14 ngày cảm nhiễm, tôm ở NT3 có tỷ lệ chết tích lũy cao hơn đáng kể ($46,7 \pm 1,9\%$) ($P < 0,05$) so với NT1, NT2, NT4 và NT5. Không có sự khác biệt về tỷ lệ chết tích lũy giữa NT4 và NT5 ($P > 0,05$) và tỷ lệ chết tích lũy của hai nghiệm thức này khác biệt có ý nghĩa so với NT1 và NT2 ($P < 0,05$). Kết quả phân tích mô bệnh học cho thấy, gan tụy của tôm cảm nhiễm có các dấu hiệu bệnh lý điển hình của tôm AHPND. Có sự khác biệt đáng kể về các chỉ tiêu tổng tế bào máu, hoạt động của phenoloxidase (PO) và phóng thích các gốc oxy tự do (RBs) ở tôm của nhóm không cho ăn và có cho ăn bổ sung β -glucan.

Trích dẫn: Trần Việt Tiên và Đặng Thị Hoàng Oanh, 2020. Ảnh hưởng của β -glucan lên đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) cảm nhiễm *Vibrio parahaemolyticus*. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(3B): 153-159.

1 GIỚI THIỆU

Ở động vật có xương sống, khả năng đáp ứng miễn dịch gồm có đáp ứng miễn dịch đặc hiệu và không đặc hiệu (miễn dịch tự nhiên), nhưng ở động vật không xương sống (trong đó có tôm) khả năng đáp ứng miễn dịch chủ yếu dựa vào miễn dịch không đặc hiệu gồm những cơ chế miễn dịch tế bào và miễn dịch thể dịch góp phần vào những phản ứng bảo vệ tôm bằng cách hạn chế sự xâm nhập hoặc làm sạch và giết những mầm bệnh vi sinh xâm nhập vào mô và máu (Yodmuang *et al.*, 2006).

Bệnh hoại tử gan tụy cấp tính (AHPND) do vi khuẩn *Vibrio parahaemolyticus* hiện đang là bệnh gây nhiều thiệt hại cho người nuôi tôm. Bệnh lây lan nhanh và tôm nhiễm bệnh có tỷ lệ chết cao. Các biện pháp phòng và trị AHPND ở tôm nuôi được áp dụng hiện nay chủ yếu là sử dụng thuốc kháng sinh. Việc sử dụng thuốc kháng sinh lan tràn không đúng nguyên tắc đã dẫn đến hiện tượng vi khuẩn kháng thuốc và dư lượng thuốc kháng sinh trong sản phẩm thủy sản làm ảnh hưởng đến chất lượng thủy sản và sức khỏe của người tiêu dùng. Để giải quyết các vấn đề đó, sử dụng chất kích thích miễn dịch tăng khả năng phòng bệnh ở tôm đang là giải pháp được người nuôi tôm chú ý nhằm hướng đến một nghề nuôi tôm ổn định và an toàn. Trong đó, β -glucan đã được nghiên cứu và cho thấy hiệu quả với mục đích tăng cường đáp ứng miễn dịch ở tôm chống lại các mầm bệnh vi sinh vật (Takahasi *et al.*, 1995; Chang *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008).

Kết quả về ảnh hưởng của việc bổ sung β -glucan lên đáp ứng miễn dịch tự nhiên của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) cảm nhiễm *Vibrio parahaemolyticus* nghiên cứu này được trình bày nhằm bổ sung thông tin làm cơ sở khoa học cho việc sử dụng chất kích thích miễn dịch hợp lý trong nuôi tôm thẻ chân trắng.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Hệ thống thí nghiệm

Thí nghiệm được thực hiện tại trại thực nghiệm, Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Tôm được bố trí trong bể nhựa có thể tích 150 L. Các bể nhựa được rửa sạch và khử trùng bằng chlorine rồi phơi khô trước khi sử dụng. Nước dùng trong thí nghiệm có độ mặn 25‰ được khử trùng bằng chlorine (30 ppm) và sục khí liên tục để loại bỏ chlorine trước khi bố trí thí nghiệm và trong suốt thời gian thí nghiệm.

2.2 Tôm thí nghiệm

Tôm thẻ chân trắng PL15 được ương trong hệ thống tuần hoàn tại Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Đến khi tôm đạt kích cỡ trung bình khoảng $1,8 \pm 0,51$ g/con thì bố trí thí nghiệm. Trước khi bố trí, tôm được kiểm tra bằng phương pháp PCR xác định âm tính với White Spot Syndrome Virus, Monodon Baculovirus và *V. parahaemolyticus*. Sau khi bố trí vào các bể thí nghiệm, tôm được thuần dưỡng 3 ngày rồi mới tiến hành thí nghiệm.

2.3 Chuẩn bị vi khuẩn và gây cảm nhiễm

Chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp phân lập từ tôm bệnh tại Trà Vinh năm 2018 được lưu trữ trong bộ sưu tập vi khuẩn của Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ. Sau khi lấy ra từ tủ -80°C, vi khuẩn được nuôi trong môi trường nutrient broth (NB, Merck) có bổ sung 1,5% NaCl (NB⁺), ủ ở 28°C trong 18 giờ, sau đó vi khuẩn được cấy sang đĩa tryptic soy agar (TSA, Merck) có bổ sung 1,5% NaCl (TSA⁺) và tiếp tục ủ ở 28°C trong 18 giờ. Ghi nhận màu sắc và hình dạng khuẩn lạc, nhuộm Gram để kiểm tra tính thuần của vi khuẩn. Khuẩn lạc vi khuẩn thuần được nuôi tăng sinh trong môi trường NB⁺ ở 28°C. Sau đó, đo và xác định mật độ vi khuẩn bằng máy so màu quang phổ ở bước sóng 610 nm để xác định mật độ vi khuẩn (CFU/ml). Tôm được gây cảm nhiễm bằng cách ngâm trong dung dịch vi khuẩn (mật độ 10^8 CFU/ml) trong 15 phút. Sau đó cho tôm và dung dịch vi khuẩn vào bể thí nghiệm. Sau 2 ngày cảm nhiễm, siphon đáy bể và thay 50% lượng nước trong bể, sau đó siphon đáy bể 2 ngày/lần, mỗi lần 30% lượng nước trong bể cho đến khi kết thúc thí nghiệm.

2.4 Bố trí và theo dõi thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 5 nghiệm thức (NT), mỗi NT lặp lại 3 lần (mật độ bố trí 30 tôm/bể), gồm có: (NT1) Đối chứng không cảm nhiễm và không cho ăn bổ sung β -glucan; (NT2) Đối chứng không cảm nhiễm và cho ăn bổ sung β -glucan; (NT3) Đối chứng cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* và không cho ăn bổ sung β -glucan; (NT4) cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* và cho ăn bổ sung β -glucan (2g/kg) 7 ngày trước cảm nhiễm; và (NT5) cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* và cho ăn bổ sung β -glucan (2g/kg) liên tục 14 ngày (7 ngày trước cảm nhiễm và 7 ngày sau cảm nhiễm).

Tôm được cho ăn thức ăn Grobest 4 lần/ngày. Lượng thức ăn bằng 5% trọng lượng thân (trước khi gây cảm nhiễm) và cho tôm ăn theo nhu cầu (sau khi gây cảm nhiễm).

β -glucan (LFA, Pháp) được bổ sung vào thức ăn rồi áo bằng dầu mực (20 ml/kg thức ăn). Thí nghiệm được thực hiện trong 21 ngày (7 ngày trước khi gây cảm nhiễm và 14 ngày sau cảm nhiễm).

Các chỉ tiêu môi trường được đo hàng ngày trong suốt thời gian thí nghiệm gồm pH, $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$, hàm lượng oxy hòa tan (DO) (đo bằng các bộ test SERA, Đức) và nhiệt độ (đo bằng nhiệt kế). Biểu hiện bệnh lý của tôm và số tôm chết được ghi nhận hàng ngày.

2.5 Phương pháp mô học

Mẫu tôm thí nghiệm (3 tôm/bể) được thu sau 3 ngày sau cảm nhiễm (số tôm thu mẫu phân tích các chỉ tiêu miễn dịch không tính vào tỷ lệ tôm chết tích lũy) để cố định khối gan tụy trong dung dịch Davidson's AFA trong khoảng 48 giờ, sau đó chuyển sang cồn 70° (Lightner, 1996). Mẫu sau khi được cắt tia định hướng thì được xử lý qua các giai đoạn khử nước với các nồng độ cồn tăng dần, làm trong bằng xylene, sau đó tẩm trong paraffin và sáp ong nóng chảy. Mẫu được đem đúc khối, cắt lát, dán lên lame và nhuộm với thuốc nhuộm haematocrylin và eosin (H&E). Tiêu bản được quan sát dưới kính hiển vi với các vật kính khác nhau và chụp hình tiêu bản đặc trưng.

2.6 Phương pháp xác định các chỉ tiêu miễn dịch

Mẫu tôm (3 tôm/bể/lần thu mẫu) được thu trước khi gây cảm nhiễm và vào ngày thứ 7 sau khi cảm nhiễm để lấy máu phân tích các chỉ tiêu miễn dịch. Số tôm thu mẫu phân tích các chỉ tiêu miễn dịch không tính vào tỷ lệ tôm chết tích lũy.

Tổng tế bào máu (THC) được xác định theo phương pháp của Le Moullac *et al.* (1997). Một trăm μL máu tôm được thu bằng kim tiêm vô trùng có chứa 900 μL dung dịch chống đông. Số lượng tế bào máu được đếm (lặp lại 2 lần) bằng buồng đếm hồng cầu và quan sát dưới kính hiển vi (40X) và tính bằng công thức: $\text{THC} = C \times 10 \times 5 \times 10 \text{ (tb/mm}^3\text{)}$ (C là tổng số tế bào máu trên 5 vùng đếm).

Hoạt tính của phenoloxidase (PO) được xác định theo phương pháp của Herández-López *et al.* (1996). 100 μL mẫu máu pha loãng trong dung dịch

chống đông sau khi được ly tâm, loại bỏ phần dịch phía trên, phần tế bào máu được hòa tan trong dung dịch đệm cacodylate-citrate, rồi ủ với 50 μL trypsin (1 mg/ml) trong 10 phút ở 26°C trước khi thêm 50 μL L-DOPA (3 mg/ml) và 800 μL cacodylate buffer. Đo mẫu bằng máy đọc khay vi thể ở bước sóng 490 nm. Mẫu đối chứng gồm 50 μL mẫu, 50 μL cacodylate buffer (thay thế trypsin) và 50 μL L-DOPA và đọc kết quả sau 1 phút.

Hoạt tính phóng thích các gốc oxy tự do (RBs) được xác định theo phương pháp của Song and Hsieh (1994). Năm mươi μL mẫu máu được và 50 μL dung dịch chống đông được làm lắng xuống trong ống eppendorf 200 μL có chứa 100 μL dung dịch poly-L-lysine (0,2%) để tăng sự kết dính của tế bào. Sau khi ly tâm, loại bỏ phần dịch phía trên, 100 μL zymosan (0,1% trong dung dịch Hanks) được cho vào và để 30 phút ở nhiệt độ phòng thì loại bỏ zymosan. Tế bào máu được rửa 3 lần với 100 μL dung dịch Hanks, nhuộm với 100 μL NBT solution (0,3%) trong 30 phút, loại bỏ NBT solution, sau đó rửa 3 lần với 100 μL methanol (70%) và để khô. Sau đó, mẫu được hòa tan với 120 μL KOH 2M và 140 μL dimethyl sulphoxide và đo bằng máy đọc khay vi thể (Multiskan Ascent 354, USA) ở bước sóng 630 nm. Mỗi mẫu máu được phân tích lặp lại 3 lần.

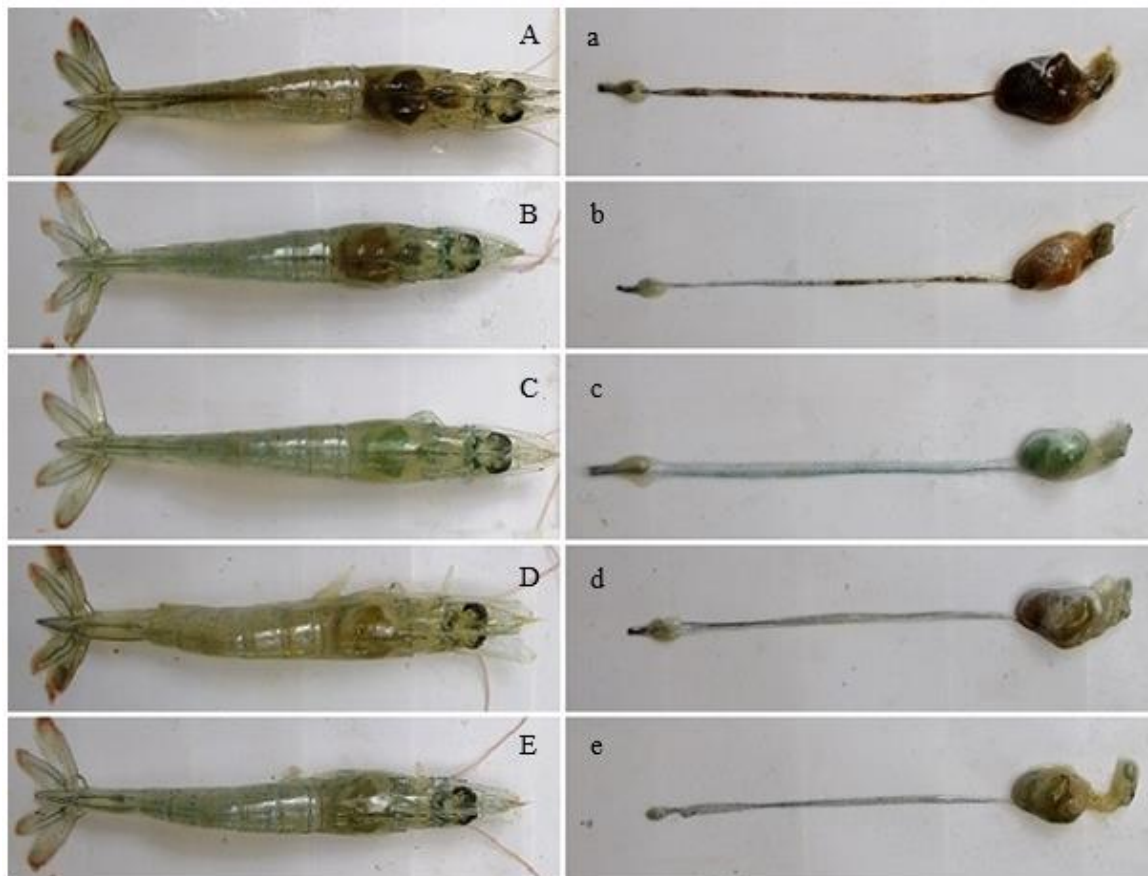
2.7 Xử lý số liệu

Sự khác biệt về tỷ lệ tôm chết tích lũy và các chỉ tiêu miễn dịch giữa các nghiệm thức thí nghiệm được xử lý thống kê ANOVA 1 nhân tố (ở mức ý nghĩa $P < 0,05$) bằng phần mềm SPSS 16.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Dấu hiệu bệnh lý

Ở các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (NT3, NT4 và NT5), tôm có biểu hiện bệnh sau 14 giờ với dấu hiệu bơi lơ đờ, hoạt động kém, ruột rỗng hoặc chứa thức ăn không liên tục, khối gan tụy của tôm nhạt màu và teo (Hình 1C/c, 1D/d và 1E/e). Các dấu hiệu ghi nhận được tương tự như mô tả của Lightner *et al.* (2012) và Flegel (2012) về các dấu hiệu bệnh lý của tôm khi mắc bệnh hoại tử gan tụy cấp tính do *V. parahaemolyticus*. Tôm ở hai nghiệm thức không cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (NT1 và NT2) có màu sắc tươi sáng, khối gan tụy bình thường, ruột đầy thức ăn, phản ứng nhạy với tiếng động (Hình 1A/a và 1B/b).

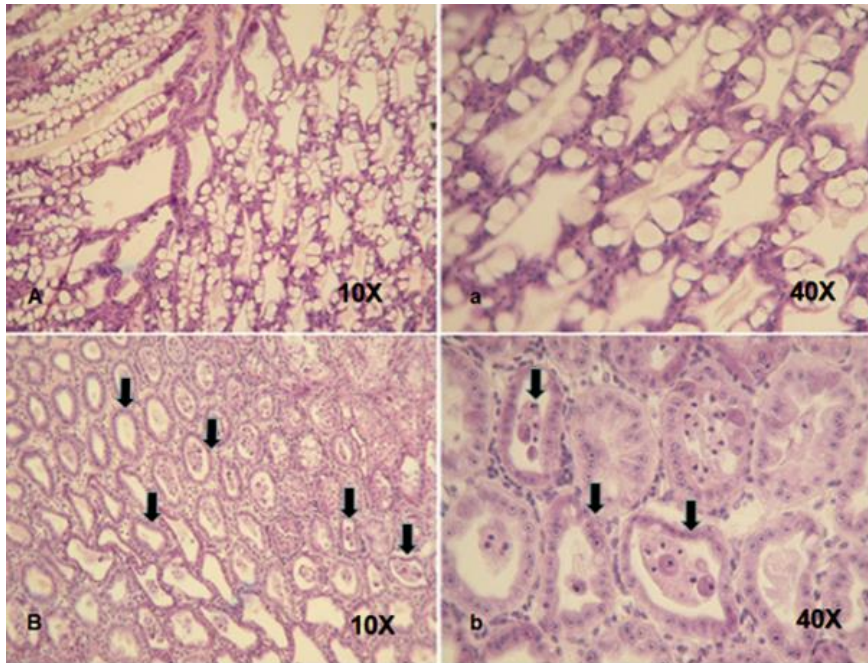


Hình 1: (A/a và B/b): Dấu hiệu bên ngoài và gan tụy của tôm ở các NT1 và NT2, gan tụy và tôm bình thường; (C/c, D/d và E/e): Dấu hiệu bên ngoài và gan tụy của tôm ở các NT3, NT4 và NT5, gan tụy nhạt màu, ruột rỗng

3.2 Mô bệnh học

Kết quả phân tích mô bệnh học cho thấy ở NT1 và NT2 (không cảm nhiễm), gan tụy với các ống gan tụy bình thường (Hình 2A/a). Tuy nhiên, ở các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus* (NT3, NT4 và NT5) gan tụy tôm có những biến đổi mô bệnh học, đặc trưng là ống gan tụy teo, giảm số lượng B, R và F (Hình 2B/b), tế bào gan tụy thoái hóa bong tróc rơi vào lòng ống gan tụy và tế bào máu xuất hiện quanh các cụm vi khuẩn

trong vùng bị hoại tử (Hình 2B/b). Lightner *et al.* (2012) và Flegel (2012) mô tả chi tiết đặc điểm mô bệnh học đặc trưng của bệnh hoại tử gan tụy cấp tính là sự thoái hóa cấp tính của gan tụy, kèm theo sự giảm hoạt động của tế bào E, rối loạn chức năng của các tế bào B, F và R, dễ thấy những tế bào có nhân trương to, các tế bào bị bong tróc và rơi vào lòng ống gan tụy và giai đoạn cuối là sự tập trung của các tế bào máu ở giữa ống gan tụy và nhiễm khuẩn thứ cấp kèm theo hiện tượng melanin hóa.



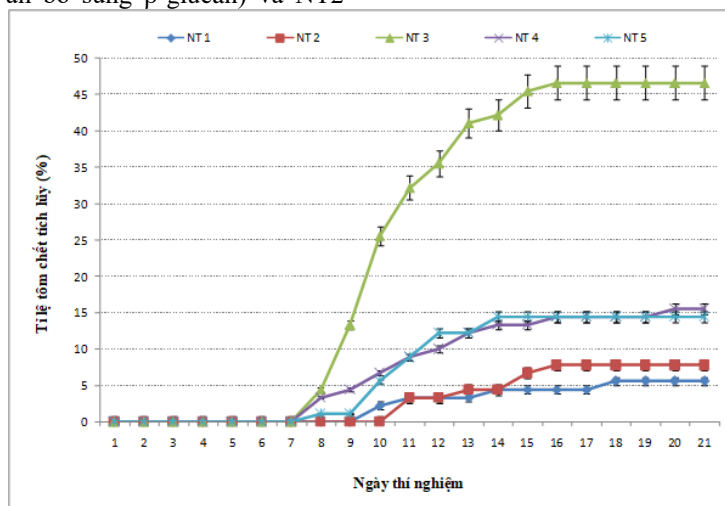
Hình 2: Mô gan tụy trên tôm không cảm nhiễm và tôm cảm nhiễm

(A/a; 10X/40X) Nghiệm thức không cảm nhiễm; (B/b; 10X/40X) Nghiệm thức cảm nhiễm AHPND. Mũi tên chỉ các tế bào gan thoái hóa và rơi vào lòng ống, các tế bào máu tập trung quanh các cụm vi khuẩn trong vùng bị hoại tử.

3.3 Tỷ lệ tôm chết tích lũy

Kết quả thí nghiệm cho thấy tỷ lệ tôm chết ở NT3 (cảm nhiễm, không cho ăn bổ sung β -glucan) với tỷ lệ tôm chết tích lũy sau 14 ngày cảm nhiễm là $46,7 \pm 1,9\%$ cao hơn có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$) so với NT1, NT2, NT4 và NT5 (với tỷ lệ tôm chết lần lượt là: $5,6 \pm 1,9\%$; $7,8 \pm 5,8\%$; $15,6 \pm 3,9\%$ và $14,4 \pm 1,9\%$). Tỷ lệ tôm chết tích lũy giữa NT1 (không cảm nhiễm, không cho ăn bổ sung β -glucan) và NT2

(không cảm nhiễm, cho ăn bổ sung β -glucan) không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Tỷ lệ tôm chết tích lũy giữa NT4 (cảm nhiễm, cho ăn bổ sung β -glucan 1 tuần trước cảm nhiễm) và NT5 (cảm nhiễm, cho ăn bổ sung β -glucan 1 tuần trước cảm nhiễm và 1 tuần sau cảm nhiễm) cũng không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$) (Hình 3) và tỷ lệ chết tích lũy của hai nghiệm thức này khác biệt có ý nghĩa so với NT1 và NT2 ($P < 0,05$).



Hình 3: Tỷ lệ tôm chết tích lũy ở các nghiệm thức qua 21 ngày thí nghiệm (7 ngày trước cảm nhiễm và 14 ngày sau cảm nhiễm)

3.4 Các chỉ tiêu miễn dịch

3.4.1 Tổng tế bào máu

Trước khi cảm nhiễm vi khuẩn, tổng tế bào máu (THC) ở tôm thí nghiệm ở tất cả các nghiệm thức không có sự khác biệt. Ở nghiệm thức đối chứng không cảm nhiễm và không cho ăn bổ sung β -glucan (NT1), THC tăng qua các lần thu mẫu trước và sau cảm nhiễm theo thời gian tăng trưởng của tôm (Bảng 1). Sau 7 ngày thí nghiệm, tôm ở các nghiệm thức cho ăn bổ sung β -glucan có THC tăng và khác biệt có ý nghĩa so với tôm ở các

nghiệm thức không cho ăn bổ sung β -glucan ($P < 0.05$). Sau 7 ngày cảm nhiễm, THC ở nghiệm thức NT3 (không cho ăn bổ sung và cảm nhiễm) giảm và khác biệt có ý nghĩa so với tôm ở các nghiệm thức còn lại ($P < 0.05$), trong khi đó, THC của tôm ở NT2 tăng có ý nghĩa ($P < 0.05$) so với NT1, NT4 và NT5. THC giảm ở các nghiệm thức cảm nhiễm vi khuẩn và cho ăn bổ sung β -glucan phù hợp với nghiên cứu của Chang *et al.* (2003) và Hsieh *et al.* (2008). Nghiên cứu của Hsieh *et al.* (2008) còn ghi nhận THC tăng sau 3 ngày cảm nhiễm gần bằng với giá trị trước cảm nhiễm.

Bảng 1: Sự biến động các chỉ tiêu miễn dịch ở tôm thí nghiệm trước và sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *V. parahaemolyticus*

Nghiệm thức	Trước khi bắt đầu cho ăn bổ sung β -glucan	Trước cảm nhiễm	7 ngày sau cảm nhiễm
Tổng tế bào máu (10^2 tb/mm³)			
NT1		176,1 \pm 3,2 ^a	191,8 \pm 3,9 ^a
NT2		194,3 \pm 5,7 ^b	203,0 \pm 6,9 ^b
NT3	130,3 \pm 1,5	177,8 \pm 5,3 ^a	180,3 \pm 6,9 ^c
NT4		195,4 \pm 6,7 ^b	193,8 \pm 4,5 ^a
NT5		195,8 \pm 4,9 ^b	195,2 \pm 5,4 ^a
PO (OD. 490 nm)			
NT1		0,200 \pm 0,019 ^a	0,204 \pm 0,008 ^a
NT2		0,202 \pm 0,007 ^a	0,215 \pm 0,009 ^a
NT3	0,137 \pm 0,025	0,201 \pm 0,007 ^a	0,198 \pm 0,020 ^b
NT4		0,202 \pm 0,011 ^a	0,206 \pm 0,003 ^a
NT5		0,202 \pm 0,006 ^a	0,207 \pm 0,004 ^a
RBs (OD. 630 nm)			
NT1		0,129 \pm 0,007 ^a	0,139 \pm 0,021 ^a
NT2		0,131 \pm 0,049 ^b	0,141 \pm 0,034 ^a
NT3	0,103 \pm 0,015	0,129 \pm 0,015 ^a	0,146 \pm 0,030 ^a
NT4		0,133 \pm 0,015 ^b	0,162 \pm 0,029 ^b
NT5		0,131 \pm 0,010 ^b	0,167 \pm 0,016 ^b

Các giá trị có ký tự khác nhau trong cùng một cột (a, b) thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$).

3.4.2 Hoạt tính của phenoloxidase

Hoạt tính của phenoloxidase ở thời điểm thu mẫu trước khi cho ăn bổ sung β -glucan và trước khi gây cảm nhiễm không khác biệt có ý nghĩa ($P > 0,05$) (Bảng 1). Sau cảm nhiễm, hoạt tính của PO ở NT3 (không cho ăn bổ sung β -glucan, cảm nhiễm *V. parahaemolyticus*) giảm có ý nghĩa so với NT1 (không cho ăn bổ sung β -glucan, không cảm nhiễm) và NT2 (cho ăn bổ sung β -glucan, không cảm nhiễm). Hoạt tính của PO ở NT4 (cho ăn bổ sung β -glucan 1 tuần trước cảm nhiễm) và NT5 (cho ăn bổ sung β -glucan 1 tuần trước cảm nhiễm và 1 tuần sau cảm nhiễm không khác biệt có ý nghĩa với hai nghiệm thức đối chứng (NT1 và NT2) (Bảng 1).

Chang *et al.* (2011) đã chỉ ra rằng hoạt tính của PO của tôm cho ăn bổ sung β -glucan tăng so với tôm

không cho ăn bổ sung β -glucan sau khi tôm được cảm nhiễm với vi khuẩn *V. alginolyticus* chứng tỏ β -glucan có khả năng hoạt hóa hệ thống enzyme PO để tạo ra các chất kháng khuẩn.

3.4.3 Hoạt tính phóng thích các gốc oxy tự do

Sau 7 ngày thí nghiệm (trước khi gây cảm nhiễm), tôm ở các nghiệm thức cho ăn bổ sung β -glucan (NT2, NT4 và NT5) có hoạt tính phóng thích các gốc oxy tự do (RBs) tăng khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) so với các nghiệm thức không cho ăn bổ sung β -glucan (NT1 và NT3). Sau 7 ngày cảm nhiễm, hoạt tính RBs của tôm ở NT4 và NT5 tăng và khác biệt có ý nghĩa ($P < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại (Bảng 1).

Theo nghiên cứu của Song and Hsieh (1994), superoxide anion và hydrogen peroxide (H_2O_2) được giải phóng ra từ các tế bào máu có vai trò quan trọng trong quá trình tiêu diệt mầm bệnh ở tôm. Sự gia tăng hoạt tính RBs chứng tỏ các gốc oxy tự do được tế bào máu tôm giải phóng ra để diệt khuẩn (Sarathi *et al.*, 2008). Trong nghiên cứu này, tôm được cho ăn bổ sung β -glucan có hoạt tính RBs tăng sau khi cảm nhiễm chứng tỏ khả năng phóng thích các gốc oxy tự do của tôm được kích thích để chống lại vi khuẩn cảm nhiễm.

Kết quả phân tích các chỉ tiêu miễn dịch cho thấy, cho tôm ăn bổ sung β -glucan sẽ làm tăng các chỉ tiêu miễn dịch THC, PO và RBs gây ảnh hưởng tích cực đến sức khỏe tôm.

4 KẾT LUẬN

Sử dụng β -glucan (liều 2 g/kg thức ăn liên tục từ 7-14 ngày) có thể kích thích làm tăng các chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu THC, PO và RBs ở tôm. Đồng thời làm giảm a lệ chết của tôm khi cảm nhiễm chủng vi khuẩn *V. parahaemolyticus* gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính.

LỜI CẢM ƠN

Các nội dung nghiên cứu trong bài báo này được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài “Nghiên cứu tác động của biến đổi khí hậu đối với sự xuất hiện của các bệnh nguy hiểm ở tôm nước lợ nuôi ở Tỉnh Trà Vinh và các giải pháp quản lý dịch bệnh hiệu quả” (Hợp đồng số: 26/HĐ-PCU) do Dự án AMD Trà Vinh cấp kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Chang, C.F., Su, M.S., Chen, H.Y. and Liao, I.C., 2003. Dietary β -1,3-glucan effectively improves immunity and survival of *Penaeus monodon* challenged with white spot syndrome virus. *Fish and Shellfish Immunology*. 15(4): 297-310.

Chang, J., Zhang, W., Mai, K. *et al.*, 2011. Effects of dietary of dietary β -glucan and glycyrrhizin on nonspecific immunity and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus* (Boone) challenged with *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture Research*. 42(8): 1101-1109.

Flegel, T.W., 2012. Historic emergence, impact and current status of shrimp pathogens in Asia.

Journal of Invertebrate Pathology. 110(2): 166-173.

Hsieh, S.L., Ruan, Y.H., Li, Y.C., Hsieh, P.S., Hu, C.H. and Kuo, C.M., 2008. Immune and physiological responses in Pacific white shrimp (*Penaeus vannamei*) to *Vibrio alginolyticus*. *Aquaculture* 275(1-4): 335-341.

Herández-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*. 113(1): 61-66.

Moullac, G., Groumellec, M., Ansquer, D., Froissard, S., Levy, P. and Aquacop, 1997. Haematological and phenoloxidase activity changes in the shrimp *Penaeus stylirostris* in relation with the moult cycle: Protection against vibriosis. *Fish and Shellfish Immunology*. 7(4): 227-234.

Li, C.C., Yeh, S.T. and Chen, J.C., 2008. The immune response of white shrimp *Litopenaeus vannamei* following *Vibrio alginolyticus* injection. *Fish and Shellfish Immunology*. 25(6): 853-860.

Lightner, D.V. (ed), 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedures for diseases of cultured penaeid shrimp. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA. pp. 1-72.

Lightner, D.V., Redman, R.M., Pantoja, C.R., Noble, B.L. and Tran, L., 2012. Early mortality syndrome affects shrimp in Asia. *Global Aquaculture Advocate*, January/February, 40.

Sarathi, M., Nazeer B.A., Ravi, M., Venkatesan, C., Kumar, S.B. and Hameed., A.S., 2008. Clearance of white spot syndrome virus (WSSV) and immunological changes in experimentally WSSV-injected *Macrobrachium rosenbergii*. *Fish and Shellfish Immunology*. 25(3): 222-230.

Song, Y.L. and Hsieh, Y.T., 1994. Immunostimulation of tiger shrimp *Penaeus monodon* haemocytes for generation of microbicidal substances: analysis of reactive oxygen species. *Developmental and Comparative Immunology*. 18(3): 201-209

Yodmuang, S., Tirasophon, W., Roshorm, Y., Chinnirunvong, W. and Panyim, S., 2006. YHV-protease dsRNA inhibits YHV replication in *Penaeus monodon* and prevents mortality. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 341(2): 351-356.