



ĐÁP ỨNG MIỄN DỊCH VÀ SỨC ĐỀ KHÁNG VỚI *Vibrio harveyi* CỦA TÔM SÚ (*Penaeus monodon*) ĂN THỨC ĂN CÓ BỔ SUNG CHẤT CHIẾT TỪ RONG MƠ (*Sargassum microcystum*)

Hồng Mộng Huyền*, Huỳnh Trường Giang và Trần Thị Tuyết Hoa

Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

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

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 17/05/2018

Ngày nhận bài sửa: 18/06/2018

Ngày duyệt đăng: 30/07/2018

Title:

Immune response and resistance to *Vibrio harveyi* of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) fed with brown seaweed (*Sargassum microcystum*) extract

Từ khóa:

Miễn dịch, rong nâu, *Sargassum microcystum*, tôm sú, *Vibrio harveyi*

Keywords:

Black tiger shrimp, brown seaweed, immune, *Sargassum microcystum*, *Vibrio harveyi*

ABSTRACT

Feeding trial was conducted to evaluate the effects of hot water-extract from the *Sargassum microcystum* supplementation in diet of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Shrimps were fed the diets supplemented with different levels of *S. microcystum* hot-water extract (0%, 0.5%, 1%, 2% of hot-water extract) for 30 days. The challenge experiment was conducted in 60 L plastic container with 30 shrimps for each treatment. Immune parameters including total haemocyte counts (THC), total granular cells (including semi-granular cells) (LGC), total hyaline cells (HC), phenoloxidase activity (PO) and resistance to *Vibrio harveyi* were evaluated. Results showed that (i) THC, LGC, HC, PO activities were significantly increased in the shrimps fed with 1% hot-water extract supplemented diet; (ii) the highest survival rate (80%) was significantly recorded in the group that was fed with 1% of hot-water-extract. The results suggested that feeding 1% hot-water extract from *S. microcystum* could enhance immune responses and resistance against *V. harveyi* in black tiger shrimp *P. monodon*.

TÓM TẮT

Thử nghiệm được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của hỗn hợp chất chiết từ rong mơ (*Sargassum microcystum*) bổ sung vào thức ăn cho tôm sú (*Penaeus monodon*). Tôm được cho ăn với chế độ ăn bổ sung hỗn hợp chất chiết rong mơ *S. microcystum* ở các hàm lượng khác nhau (0%, 0,5%, 1%, 2% chiết xuất từ rong mơ), cho ăn liên tục trong 30 ngày. Thí nghiệm cảm nhiễm với vi khuẩn *Vibrio harveyi* được tiến hành trong xô nhựa 60 L với 30 con tôm/nghiệm thức. Các chỉ tiêu miễn dịch của tôm thí nghiệm bao gồm tổng số tế bào bạch cầu (THC), số lượng tế bào bạch cầu có hạt (LGC), số lượng tế bào bạch cầu không hạt (HC), hoạt tính phenoloxidase (PO) và sức đề kháng với *V. harveyi* được đánh giá. Kết quả cho thấy: (i) THC, LGC, HC và hoạt tính enzyme PO gia tăng đáng kể trong nhóm bổ sung 1% chiết xuất từ rong mơ, (ii) tỉ lệ sống cao nhất (80%) được ghi nhận ở nhóm ăn thức ăn bổ sung với nồng độ 1% chất chiết từ rong mơ sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *V. harveyi*. Đồng thời, việc cho ăn 1% hỗn hợp chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* có thể tăng khả năng đáp ứng miễn dịch và kháng lại *V. harveyi* ở tôm sú.

Trích dẫn: Hồng Mộng Huyền, Huỳnh Trường Giang và Trần Thị Tuyết Hoa, 2018. Đáp ứng miễn dịch và sức đề kháng với *Vibrio harveyi* của tôm sú (*Penaeus monodon*) ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ rong mơ (*Sargassum microcystum*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 54(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 158-167.

1 GIỚI THIỆU

Tôm sú, *Penaeus monodon*, được nuôi chủ yếu ở Châu Á vào thời gian trước năm 2000. Sau đó, với sự xuất hiện của tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) sạch bệnh (SPF - specific pathogen free) thì đối tượng này được lựa chọn nuôi phổ biến trên toàn cầu, với mong muốn hạn chế được bệnh đốm trắng (Thitamadee *et al.*, 2016). Tuy nhiên, thực tế ghi nhận cả hai loài tôm sú và tôm thẻ chân trắng đều cùng nhiễm nhiều tác nhân gây bệnh, đặc biệt là virus gây bệnh đốm trắng (white spot syndrome virus - WSSV) (Lo *et al.*, 2012), virus gây bệnh đầu vàng (yellow head virus - YHV) (Cowley *et al.*, 2012), “bệnh tôm chết bí ẩn” (covert mortality nodavirus - CMNV) (Zhang *et al.*, 2014), bệnh do vi bào tử trùng (enterocytozoon hepatopenaei - EHP) (Chayaburakul *et al.*, 2004; Tangprasittipap *et al.*, 2013), bệnh hoại tử gan tụy cấp tính do *Vibrio parahaemolyticus* (Loc *et al.*, 2013). Vi khuẩn *Vibrio harveyi*, *V. splendidus*, *V. orientalis*, *V. fischeri* được xác định là tác nhân gây bệnh phát sáng trên tôm. Tuy nhiên, *V. harveyi* được xác định là tác nhân chính gây bệnh phát sáng trên tôm sú. Bệnh phát sáng được tìm thấy trên ấu trùng, hậu ấu trùng tôm sú và gây thiệt hại đến kinh tế và nghề nuôi tôm của nhiều nước trên thế giới, đặc biệt như ở Indonesia (Sunaryanto and Mariam, 1986), Thái Lan (Jiravanichpaisal *et al.*, 1994), Philippines (Baticados *et al.*, 1990; Lavilla-Pitogo *et al.*, 1990), Australia (Pizzutto and Hirst, 1995), Đài Loan (Liu *et al.*, 1996) và Ecuador (Robertson *et al.*, 1998).

Hiện nay, nhu cầu sử dụng rong biển rất lớn, chúng có vai trò như nguồn lương thực, thức ăn cho gia súc, phân bón và nguồn dược liệu (Sánchez-Machado *et al.*, 2004). Trong đó, ngành rong nâu được xác định là nguồn nguyên liệu giàu hoạt chất sinh học với nhiều hoạt tính sinh học cao như chống oxy hóa, kháng khuẩn, kháng nấm, chống đông tụ, chống bức xạ UV-B, có khả năng làm lành vết thương và tái tạo cấu trúc tế bào, giúp tăng cường miễn dịch (Liu *et al.*, 2012). Cụ thể, fucoidan là chất được ly trích từ rong nâu, có chứa polysaccharides sulfate, có thể giúp tăng cường miễn dịch cho tôm sú, tôm thẻ chân trắng chống lại virus gây bệnh đốm trắng (WSSV), hay bệnh đỏ thân do vi khuẩn *V. alginolyticus* (Pantakar *et al.*, 1993; Blondin *et al.*, 1994; Immanuel *et al.*, 2012; Kitikiew *et al.*, 2013). Rong mơ *Sargassum microcystum* phân bố phổ biến ở nhiều vùng biển miền Nam Việt Nam, chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* có hoạt tính chống oxy hóa cao (Huỳnh Trường Giang và *ctv.*, 2013). Rong mơ (*Sargassum microcystum*) phân bố phổ biến ở nhiều vùng biển miền Nam Việt Nam, chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* có hoạt tính chống oxy hóa cao (Huỳnh Trường Giang và *ctv.*, 2013). Do đó, *S.*

microcystum rất có tiềm năng trong việc kích thích miễn dịch, giúp tôm, cá tăng cường sức đề kháng chống lại mầm bệnh. Tuy nhiên, điều kiện khí hậu, vùng biển nuôi trồng cũng gây ra sự khác biệt về thành phần dinh dưỡng của rong biển (Darcy-Vrillon 1993; Burtin 2003). Các thử nghiệm cần được thực hiện để xác định phương pháp chiết xuất, liều lượng sử dụng, thời gian bổ sung nhằm tăng khả năng đề kháng với tác nhân gây bệnh của một số đối tượng nuôi thủy sản khi được bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum*. Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện nhằm mục tiêu xác định liều lượng bổ sung chất chiết rong mơ *S. microcystum* giúp phòng bệnh phát sáng do vi khuẩn *V. harveyi* trên tôm sú.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Vật liệu nghiên cứu

Mẫu vật dùng trong nghiên cứu gồm: (i) Chiết xuất từ rong mơ *S. microcystum* (được thu từ vùng biển Hà Tiên - Kiên Giang), bột rong mơ được đun sôi 100°C, sau 3 giờ dung dịch được lọc qua lưới lọc có mắt lưới 27 µm bằng hệ thống lọc chân không (Huỳnh Trường Giang và *ctv.*, 2013); (ii) Tôm sú có trọng lượng 5-7 g/con được chuyển về phòng thí nghiệm và thuần dưỡng ở độ mặn 15‰, nhiệt độ 28-30°C. Tôm được cho ăn bằng thức ăn viên có bổ sung chất chiết từ rong nâu *S. microcystum* ở các hàm lượng khác nhau bao gồm 0% (đối chứng), 0,5%, 1% và 2% chế độ 2 lần/ngày, trong 30 ngày thì tiến hành cảm nhiễm; (iii) Chủng vi khuẩn *V. harveyi* từ bộ sưu tập mẫu bệnh của Bộ môn Bệnh học Thủy sản, Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ được sử dụng cho thí nghiệm gây nhiễm trên tôm sú.

2.2 Thí nghiệm cảm nhiễm tôm với *Vibrio harveyi*

Tôm sú thí nghiệm được cảm nhiễm với vi khuẩn *V. harveyi* bằng phương pháp ngâm (Loc *et al.*, 2013), nồng độ vi khuẩn cảm nhiễm thông qua thí nghiệm xác định giá trị LD₅₀, liều gây chết tôm với tỉ lệ 50% (2x10⁸ cfu/ml). Thí nghiệm cảm nhiễm được thực hiện với năm nghiệm thức, mỗi nghiệm thức lặp lại ba lần và số lượng tôm bố trí 10 con/bể, bao gồm: Tôm ăn thức ăn bổ sung 0,5%, 1%, 2% và không bổ sung (0%) chất chiết xuất từ rong mơ *S. microcystum* – cảm nhiễm *V. harveyi*, tôm ăn thức ăn không bổ sung chất chiết xuất từ rong mơ *S. microcystum* – cảm nhiễm bằng nước muối sinh lý (đối chứng âm). Tôm sau khi cảm nhiễm được tiếp tục cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết xuất từ rong mơ *S. microcystum*, cho ăn theo nhu cầu với chế độ cho ăn 2 lần/ngày. Thí nghiệm được thực hiện trong vòng 14 ngày, tôm được theo dõi và ghi nhận (i) dấu hiệu bệnh lý, tỉ lệ chết; (ii) cổ định gan tụy, mang,

cor tôm dùng cho phân tích mô học, (iii) mẫu mang tôm được cố định trong ethanol để thực hiện phản ứng chuỗi trùng hợp (PCR) nhằm tái khẳng định vi khuẩn cảm nhiễm.

Tỉ lệ chết tích lũy (%) = (Tổng số tôm chết cộng dồn theo ngày/ Tổng số tôm thí nghiệm) × 100

2.3 Phân tích các chỉ tiêu miễn dịch

Tôm được thu ngẫu nhiên 3 con/bể, dùng để phân tích các chỉ tiêu miễn dịch ở thời điểm sau 30 ngày ăn thức ăn bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* với các nồng độ khác nhau. Các mẫu tôm được phân tích các chỉ tiêu miễn dịch bao gồm: (i) xác định tổng số tế bào bạch cầu (THC) (Le Moullac *et al.*, 1997), định loại bạch cầu (Cornick and Stewart, 1978), (iii) xác định hoạt tính phenoloxidase (PO) (Herández-Lospez *et al.*, 1996).

2.4 Phương pháp PCR phát hiện vi khuẩn phát sáng *V. harveyi*

Mẫu tôm (2 con/bể) nhiễm vi khuẩn phát sáng *V. harveyi* được phát hiện bằng qui trình PCR (Sun *et al.*, 2009), với sản phẩm khuếch đại 159 bp.

2.5 Phương pháp phân tích mô học

Tôm có dấu hiệu bệnh lý/gần chết (2 con/bể) được cố định trong dung dịch Davidson's AFA sau 24 giờ được chuyển sang dung dịch ethanol 70%. Mẫu được xử lý và nhuộm với Harris's

Haematoxylin và Eosin (Lightner, 1996). Tàng cor quan được phân tích và xác định sự biến đổi mô học.

2.6 Xử lý số liệu

Các số liệu thu được nhập liệu và xử lý bằng phần mềm Excel. Chương trình SPSS 20.0 phân tích ANOVA 1 nhân tố được sử dụng với phép thử Duncan ở mức ý nghĩa $p < 0,05$.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của thức ăn bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* lên các chỉ tiêu miễn dịch của tôm sú

Tôm sú ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* sau 30 ngày, được xác định các chỉ tiêu huyết học. Kết quả phân tích cho thấy khi bổ sung chất chiết từ rong mơ ở các nồng độ khác nhau từ 0,5% đến 2% thì tôm sú có sự cải thiện đáp ứng miễn dịch. Trong đó, nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết từ rong mơ có sự đáp ứng miễn dịch tăng cao hơn các nghiệm thức còn lại. Cụ thể là chỉ tiêu THC tăng cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức bổ sung 2%, 0,5% và đối chứng. Tương tự, THC ở nghiệm thức bổ sung 0,5% cũng có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức bổ sung 2% và đối chứng. Tuy nhiên, chỉ tiêu này ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết từ rong mơ lại không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng (Bảng 1).

Bảng 1: Tổng tế bào máu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt và hoạt tính PO của tôm sú sau khi cho ăn thức ăn bổ sung các nồng độ khác nhau chất chiết từ rong mơ *S. microcystum*

Nghiệm thức	Thông số miễn dịch			
	THC (10^4 tb/mm ³)	LGC (10^4 tb/mm ³)	HC (10^4 tb/mm ³)	PO (490 nm)
0%	1,21±0,03 ^c	1,08±0,03 ^b	0,13±0,04 ^c	0,123±0,008 ^c
0,5%	1,60±0,08 ^b	1,41±0,08 ^a	0,19±0,01 ^b	0,146±0,006 ^b
1,0%	1,71±0,06 ^a	1,45±0,08 ^a	0,26±0,04 ^a	0,169±0,007 ^a
2,0%	1,19±0,02 ^c	1,06±0,03 ^b	0,12±0,02 ^c	0,118±0,003 ^c

Giá trị trung bình ± độ lệch chuẩn. Các giá trị trên cùng một cột mang mẫu tự (a,b,c) giống nhau thể hiện a,b,c; chỉ số thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). THC: tổng số tế bào bạch cầu; LGC: tế bào có hạt; HC: tế bào không hạt và PO: hoạt tính enzyme phenoloxidase

Khi khảo sát sự biến động về số lượng từng loại bạch cầu, ở chỉ tiêu LGC (large granular cells – bạch cầu có hạt) nghiệm thức bổ sung 0,5%, 1% chất chiết từ rong mơ ghi nhận sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức bổ sung 2% và đối chứng. Tuy nhiên, ở chỉ tiêu HC (hyaline cells – bạch cầu không hạt) ghi nhận chỉ riêng nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết từ rong mơ khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức bổ sung 0,5%, 2% và đối chứng (0%). Nghiệm thức bổ sung 0,5% chất chiết cho kết quả khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức 2% và đối chứng. Nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết từ rong mơ không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê

($p > 0,05$) so với nghiệm thức đối chứng không bổ sung chất chiết từ rong mơ (Bảng 1). Kết quả trên cho thấy tôm sú khi được cho ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ rong mơ đã cải thiện đáp ứng miễn dịch tương ứng với từng nồng độ bổ sung khác nhau. Đặc biệt là nghiệm thức bổ sung 1% đã có những biểu hiện về việc tăng THC ($1,71 \times 10^4$ tb/mm³) cao hơn nghiệm thức đối chứng ($1,21 \times 10^4$ tb/mm³), kể đó là nghiệm thức bổ sung 0,5% ($1,60 \times 10^4$ tb/mm³). Nguyên nhân có thể là do chất chiết từ rong mơ với thành phần hóa học chính là hỗn hợp polysaccharide, và các thành phần khác đóng vai trò như một chất chống oxy hóa, có khả năng giúp tăng cường miễn dịch. Vật thể lạ khi xâm nhập vào cơ thể

tôm sẽ kích thích hệ thống miễn dịch không đặc hiệu của tôm hoạt động tăng lên để nhằm bảo vệ cơ thể. Sự xâm nhập của vật thể lạ kéo theo hàng loạt các quá trình đáp ứng miễn dịch cả về đáp ứng miễn dịch dịch thể và đáp ứng miễn dịch tế bào (Jiravanichpaisal *et al.*, 2006).

Tương tự, nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết từ rong mơ cũng có hoạt tính PO tăng cao và khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với các nghiệm thức còn lại. Kế đó là nghiệm thức bổ sung 0,5% chất chiết từ rong mơ cũng khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với nghiệm thức bổ sung 2% và nghiệm thức không bổ sung chất chiết từ rong mơ. Nghiệm thức bổ sung 2% không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với nghiệm thức không bổ sung chất chiết từ rong mơ. Đối với nghiệm thức bổ sung 2% thì có biểu hiện bất mỗi chậm và ăn ít hơn các nghiệm thức còn lại. Điều đó cũng có thể ảnh hưởng đến sự đáp ứng miễn dịch của tôm trong suốt thời gian thực hiện thí nghiệm. Nguyên nhân có thể là do nồng độ bổ sung khá cao, mùi của chất chiết từ rong mơ làm ảnh hưởng đến khả năng bắt mồi của tôm. Hoạt tính PO là một thành phần quan trọng trong hệ thống miễn dịch dịch thể của giáp xác, giúp nhận dạng vật thể lạ; hệ thống này được kích hoạt khi được tác động bởi các thành phần của vách tế bào vi khuẩn, chẳng hạn như peptidoglycan, β -1,3-glucan, lipopolysaccharide và dẫn đến proPO chuyển thành PO (Ashida *et al.*, 1990). PO được lưu trữ và kích trong tế bào có hạt (granular cells) và tế bào bán hạt (semi-granular cells).

Kết quả ghi nhận của thí nghiệm tương tự với kết quả nghiên cứu của Sivagnanavelmurugan *et al.* (2014) khi sử dụng fucoïdan bổ sung vào thức ăn tôm. Thí nghiệm bổ sung fucoïdan với hàm lượng khác nhau (0,1, 0,2, 0,3%) vào thức ăn của tôm sú và đánh giá khả năng bảo vệ của fucoïdan giúp tôm sú chống lại vi khuẩn *V. parahaemolyticus*. Kết quả ghi nhận: (i) nghiệm thức đối chứng ăn thức ăn không chứa fucoïdan và không cảm nhiễm *V. parahaemolyticus* thì sau 21 ngày thí nghiệm, chỉ tiêu tổng tế bào máu không thay đổi duy trì ở mức $52,9 \times 10^5$ tb/ml; (ii) ở nghiệm thức đối chứng dương ăn thức ăn không chứa fucoïdan và cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thì chỉ tiêu tổng tế bào máu giảm khác biệt có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức còn lại; (iii) ngược lại, các nghiệm thức có bổ sung fucoïdan và cảm nhiễm với vi khuẩn *V. parahaemolyticus* thì tổng tế bào máu tăng lên khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với trước cảm nhiễm. Fucoïdan là một loại fucose có chứa polysaccharides sulfate có nhiều trong rong nâu. Một nghiên cứu trước đây ghi nhận fucoïdan có hoạt tính sinh học bao gồm: các hợp chất chống đông và các hoạt động chống huyết khối, ảnh hưởng đến hệ

thống miễn dịch và viêm, có tác dụng ngăn cản sự phát triển của tế bào ung thư, sự bám dính trên các tế bào và bảo vệ tế bào khỏi bị lây nhiễm (Zhuang *et al.*, 1995).

Ngoài ra, một nghiên cứu khác cũng ghi nhận sử dụng chất chiết xuất từ rong câu (*Gracilaria tenuistipitata*) giúp tăng khả năng miễn dịch của tôm thẻ chân trắng đối với bệnh đốm trắng. Cụ thể, kết quả xác định tổng tế bào máu tăng lên khi tôm tiếp xúc với chất chiết từ rong câu, nhưng sau khi cảm nhiễm với WSSV, giá trị này giảm xuống theo thời gian; kết quả ghi nhận có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) giữa nghiệm thức bổ sung và nghiệm thức đối chứng (Lin *et al.*, 2011). Các nghiên cứu trên cho thấy rong có khả năng giúp tăng cường miễn dịch chống lại mầm bệnh, đặc biệt là nấm rong nâu. Tuy nhiên, khả năng này còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố như cách thức bổ sung, liều lượng sử dụng và phương pháp chiết xuất cũng là yếu tố quan trọng. Nếu như quá trình bổ sung không phù hợp sẽ ảnh hưởng đến khả năng bảo vệ tôm đối với mầm bệnh. Trong nghiên cứu này để đánh giá khả năng bảo vệ của chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* lên tôm sú, thí nghiệm được tiến hành cảm nhiễm với vi khuẩn *V. harveyi*, tác nhân chính gây bệnh phát sáng trên tôm.

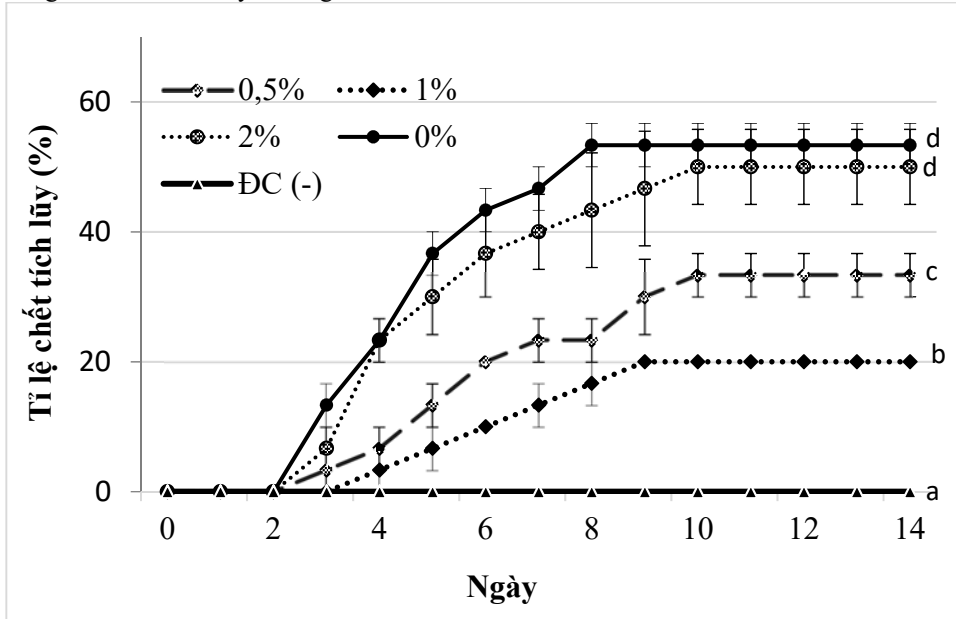
3.2 Ảnh hưởng của thức ăn bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* lên khả năng đề kháng với vi khuẩn gây bệnh phát sáng *V. harveyi*

Tôm sú ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* với các nồng độ khác nhau sau 30 ngày được gây cảm nhiễm với *V. harveyi* bằng phương pháp ngâm. Quá trình theo dõi ghi nhận tôm sau hai ngày cảm nhiễm có biểu hiện bơi lội chậm, bắt mồi kém; đến ngày thứ ba, tôm bắt đầu chết ở một số nghiệm thức, cao nhất là ở nghiệm thức không bổ sung chất chiết từ rong mơ, tiếp theo là nghiệm thức bổ sung 2% và nghiệm thức 0,5% với tỉ lệ chết khác nhau. Đến ngày thứ tư sau khi cảm nhiễm thì nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết từ rong mơ bắt đầu có tôm chết. Tỉ lệ chết ở các nghiệm thức tăng cao dần vào các ngày tiếp theo, tuy nhiên nhìn chung, ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết, tôm ngưng chết vào ngày 10 sau cảm nhiễm, đối với nghiệm thức đối chứng (nghiệm thức không bổ sung chất chiết từ rong mơ) tôm ngưng chết vào ngày tám sau cảm nhiễm với tỉ lệ chết là 53, 33%. Tỉ lệ chết tích lũy của tôm sú ở các nghiệm thức cho ăn chất chiết từ rong mơ với các nồng độ khác nhau sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh phát sáng *V. harveyi* được trình bày ở Hình 1.

Đối với nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết từ rong mơ có tỉ lệ chết tích lũy thấp nhất sau 14 ngày theo dõi với 20%, tiếp theo là nghiệm thức bổ sung

0,5% với 33,33%. Tỷ lệ chết tích lũy cao nhất vẫn là nghiệm thức đối chứng (nghiệm thức không bổ sung chất chiết xuất từ rong mơ) là 53,33%. Kết quả tỷ lệ chết cũng tương đối cao ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết xuất từ rong nâu với 50% sau 14 ngày cảm nhiễm. Những con tôm chết này được ghi nhận các

dấu hiệu bệnh lý bao gồm: đường ruột là những sợi màu hồng (do ăn tôm chết) hoặc trắng (do bỏ ăn ruột rỗng), dưới lớp vỏ tôm có màu hồng như xuất huyết (đỏ thân), đồng thời một số con có dấu hiệu mòn đuôi và phụ bộ (Hình 2).



Hình 1: Biểu đồ thể hiện tỷ lệ chết tích lũy của tôm sú sau 14 ngày cảm nhiễm với *V. harveyi*

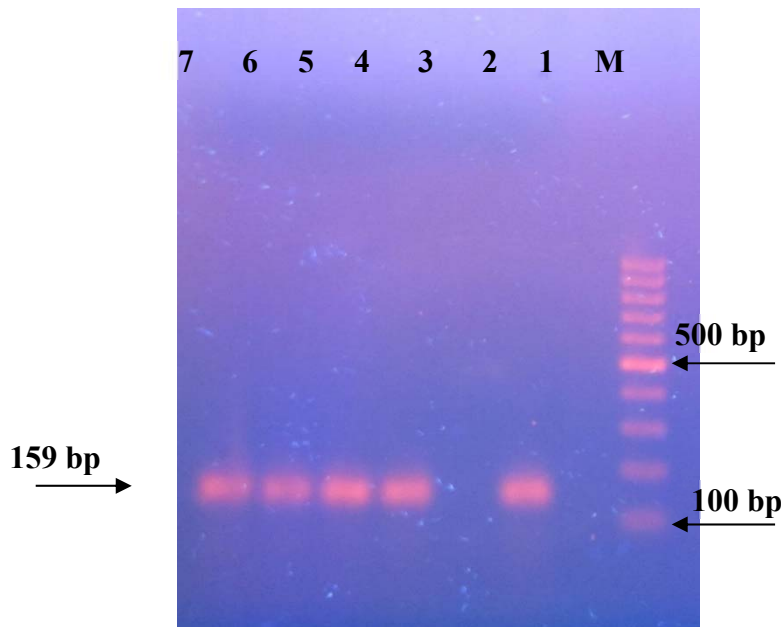


Hình 2: Tôm sú thí nghiệm sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn *V. harveyi* (A) Tôm sú nhiễm vi khuẩn *V. harveyi* có màu hồng; (B) Tôm sú không nhiễm vi khuẩn *V. harveyi* có màu sắc bình thường

Các mẫu tôm cảm nhiễm có dấu hiệu yếu, sắp chết được thu và phân tích với phương pháp mô học và PCR nhằm kiểm tra lại khả năng lây nhiễm của *V. harveyi* đến tôm sú cảm nhiễm.

Sau khi khuếch đại với cặp mồi đặc hiệu của vi khuẩn *V. harveyi*, kết quả điện di cho thấy mẫu ở tất cả các nghiệm thức cảm nhiễm với vi khuẩn đều

xuất hiện vạch sáng ở 159 bp, tương ứng với đối chứng dương của phản ứng PCR (giếng 4, 5, 6, 7, Hình 3). Như vậy, tôm chết ở các nghiệm thức cảm nhiễm đều có nhiễm vi khuẩn *V. harveyi*. Ngược lại, mẫu khuếch đại từ nghiệm thức không cảm nhiễm vi khuẩn cho kết quả âm tính, không xuất hiện vạch trên băng thạch (giếng 3, Hình 3).



Hình 3: Kết quả PCR phát hiện *V. harveyi* với các mẫu tôm sú được cảm nhiễm

Giếng M: thang đo DNA; Giếng 1: đối chứng âm, Giếng 2: đối chứng dương; Giếng 3: mẫu ở nghiệm thức đối chứng âm; Giếng 4: mẫu ở nghiệm thức bổ sung 0,5% chất chiết từ rong nâu; Giếng 5: mẫu ở nghiệm thức bổ sung 1% chất chiết từ rong nâu; Giếng 6: mẫu ở nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết từ rong nâu; Giếng 7: mẫu ở nghiệm thức không bổ sung (0%) chất chiết từ rong nâu.

Nghiên cứu về khả năng bảo vệ tôm chống lại vi khuẩn *V. harveyi* cũng đã có nhiều công bố về tính hiệu quả của một số hợp chất chiết xuất từ rong. Cụ thể, Traifalgar *et al.* (2013) đánh giá hiệu quả của *Fucus vesiculosus* fucoidan (FCD), *Eucheuma cottonii* K-carrageenan (CAR), heat-killed *Vibrio harveyi* cells (VHK), *Vibrio harveyi* lipopolysaccharide (VLP) và yeast β -glucan (BGN) trong việc tăng cường miễn dịch và giúp tôm sú kháng lại *V. harveyi* với chế độ bổ sung 2,0 g/kg thức ăn trong hai tuần liên tục. Kết quả cho thấy tỉ lệ sống của tôm sau khi gây nhiễm vi khuẩn *V. harveyi* đạt được rất cao, cụ thể FCD (82,2%), BGN (84,4%) và VLP (84,4%) so với đối chứng (51,1%), CAR (55,6%) và VHK (42,2%). Như vậy, chế độ ăn bổ sung VLP, BGN và FCD với liều 2,0 g/kg có thể thúc đẩy đáp ứng miễn dịch và tăng cường sức đề kháng của *P. monodon* kháng bệnh vi khuẩn.

Nghiên cứu của Kanjana *et al.* (2011) đã được tiến hành để xác định chiết xuất dung môi từ một loại rong đỏ *Gracilaria fisheri* có thể sử dụng cho phòng ngừa và điều trị Vibriosis trên tôm. Kết quả cho thấy các chiết xuất từ dung môi ethanol, methanol và chloroform có hiệu lực kháng lại *V. harveyi* với nồng độ ức chế tối thiểu trong khoảng 90-190 mg/ml, tương đương với kháng sinh norfloxacin. Các chiết xuất ethanol không gây độc cho tôm, chúng được giàu hóa trong Artemia sau đó làm thức ăn cho hậu ấu trùng tôm sú. Nhóm hậu ấu

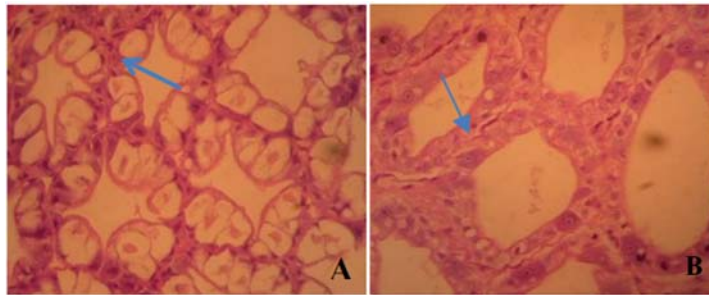
trùng tôm sú được cho ăn Artemia giàu hóa đã cho tỉ lệ chết thấp hơn so với nhóm đối chứng khi cảm nhiễm với *V. harveyi*. Ngoài ra, nhóm hậu ấu trùng tôm sú được cho ăn Artemia giàu hóa cho thấy sự gia tăng đáng kể về số lượng tổng số tế bào máu, bạch cầu bán hạt và bạch cầu hạt khi so sánh với tôm đối chứng. Tương tự, các nhóm enzyme phenoloxidase, superoxide dismutase và superoxide anion cũng được ghi nhận tăng ở nhóm hậu ấu trùng tôm sú được cho ăn Artemia giàu hóa. Bên cạnh đó, các polysaccharide fucoidan chiết xuất từ rong nâu *Cladosiphon okamuranus* và *Sargassum polycystum* cũng có khả năng giúp tôm *Metapenaeus japonicus* và tôm sú (*P. monodon*) chống lại virus gây bệnh đốm trắng (Takahashi *et al.*, 1998) hay ức chế sự phát triển của *V. harveyi*, *Staphylococcus aureus* và *Escherichia coli* (Chotigeat *et al.*, 2004). Chiết xuất polysaccharide từ *Sargassum fusiforme* cũng được đánh giá có khả năng giúp tăng cường hoạt động miễn dịch ở tôm *Fenneropenaeus chinensis* (Huang *et al.*, 2006).

Gần đây, Kitikiew *et al.* (2013) thực hiện kiểm tra ảnh hưởng của fucoidan đến một số chỉ tiêu miễn dịch của tôm thẻ chân trắng và khả năng giúp tôm kháng lại vi khuẩn *Vibrio alginolyticus*. Tôm được thử nghiệm ngâm với fucoidan ở nồng độ 100, 200 và 400 mg/l trong 3 giờ. Kết quả cho thấy sự tăng sinh tế bào máu và các chỉ số phân bào của các mô tạo máu. Ngoài ra, trong một thí nghiệm khác, số

lượng tế bào máu, hoạt tính PO và RBs đã được kiểm tra sau khi tôm được cho ăn thức ăn có chứa fucoidan với hàm lượng 0 (đối chứng), 0,5, 1,0 và 2,0 g/kg thức ăn, cho ăn liên tục 7-21 ngày. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu số lượng tế bào máu, hoạt tính PO và RBs tăng trực tiếp theo thời gian bổ sung fucoidan. Các thông số miễn dịch của nhóm tôm ở nghiệm thức bổ sung 1,0 g/kg tăng cao hơn đáng kể so với nhóm tôm bổ sung 2,0 g/kg ở thời điểm 14 ngày và 21 ngày thí nghiệm. Chỉ tiêu hoạt động thực bào ở nhóm tôm bổ sung 1,0 g/kg tăng cao hơn đáng kể so với nhóm tôm bổ sung 0, 0,5 và 2,0 g/kg. Thử nghiệm cảm nhiễm *V. alginolyticus* ở nhóm tôm đã được bổ sung Fucoidan trong 21 ngày cho thấy nhóm tôm ăn thức ăn bổ sung fucoidan hàm lượng 1,0 và 2,0 g/kg có tỉ lệ sống cao hơn đáng kể hơn so với nhóm đối chứng và nhóm tôm bổ sung lượng 0,5 g/kg trong vòng 96-120 giờ cảm nhiễm. Nhóm tác giả kết luận fucoidan chiết xuất từ tảo có khả năng giúp kích thích hệ miễn dịch không đặc hiệu của tôm bằng việc tăng sinh tế bào máu, kích hoạt proPO và các chỉ số phân bào của các mô tạo máu. Với chế độ cho ăn bổ sung fucoidan ở mức 1,0 g/kg thức ăn sẽ giúp tăng cường các chỉ số miễn dịch của tôm và giúp tôm chống lại mầm bệnh vi khuẩn *V.*

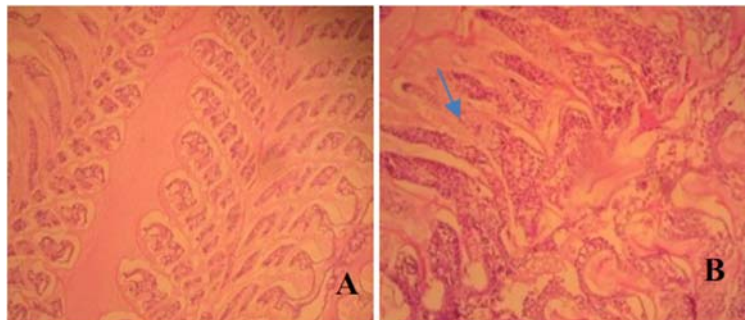
alginolyticus. Như vậy, chế độ ăn và liều lượng bổ sung hợp lý của chất tăng cường miễn dịch sẽ góp phần giúp tôm chống lại sự xâm nhập và khả năng gây hại của mầm bệnh.

Phản ứng PCR chỉ đánh giá được tôm thí nghiệm chết có nhiễm vi khuẩn *V. harveyi*. Do vậy, khảo sát đặc điểm mô bệnh học của các mẫu tôm cảm nhiễm *V. harveyi* để xác định khả năng vi khuẩn gây bệnh xâm nhập vào tế bào nhằm giúp kiểm chứng lại kết quả cảm nhiễm. Phân tích mẫu mô bệnh học giúp đánh giá và so sánh được sự tác động của vi khuẩn lên tế bào giữa các nhóm tôm sử dụng chất chiết từ rong mơ với các nồng độ khác nhau. Mỗi tác nhân gây bệnh khác nhau sẽ tạo ra những biến đổi cấu trúc khác nhau ở từng cơ quan của tôm. Ngoài ra với từng giai đoạn ủ bệnh thì sự biến đổi cấu trúc này cũng khác nhau, đặc biệt là trên các cơ quan đích của tác nhân gây bệnh trên tôm (gan tụy, mang, cơ...) (Lightner, 1996). Đối với mô khôe, các tế bào của cơ quan này luôn có cấu trúc đặc trưng và dễ nhận dạng nhưng khi có sự xâm nhập của tác nhân gây hại (vi khuẩn, virus...) thì những cấu trúc này sẽ biến đổi và làm mất đi chức năng vốn có của nó.



Hình 4: Sự thay đổi cấu trúc mô gan tụy của tôm sú ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* và cảm nhiễm với *V. harveyi*

(A) Mô gan tụy có sự xâm nhập tế bào máu giữa các ống gan tụy (mũi tên); (B) Mô gan tụy ở tôm cảm nhiễm vi khuẩn có sự xâm nhập của vi khuẩn (mũi tên) và ống gan tụy teo



Hình 5: Sự thay đổi cấu trúc mô mang của tôm sú ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* và cảm nhiễm với *V. harveyi*

(A) Tôm khôe với cấu trúc mang không biến đổi; (B) sự xâm nhập của tế bào máu, mô mang co lại.

Trong nghiên cứu này, mẫu mô gan tụy, mang và cơ tôm sú được quan sát để đánh giá sự cảm

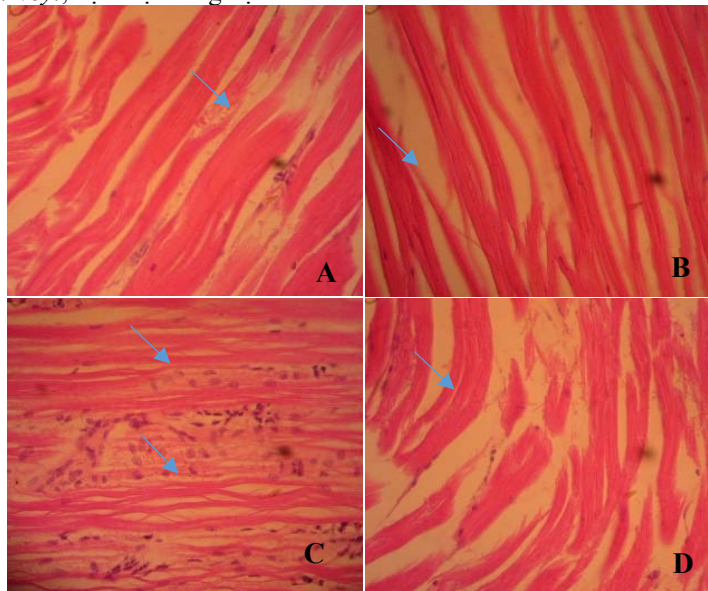
nhiễm với vi khuẩn phát sáng *V. harveyi* lên tôm sú thí nghiệm. Vibriosis sẽ gây ra sự tan huyết, hoại tử bên trong các cơ quan lymphoid, tim, làm mất liên

kết mô mang, gan tụy, tuyến râu, dây thần kinh, gai đuôi và cơ (Anderson *et al.*, 1988; Mohney *et al.*, 1991; Jiravanichpaisal *et al.*, 1994). Gan, tụy tôm nhiễm bệnh xuất hiện ít các tế bào không bào (vacuolated), các hạt lipid và glycogen giảm (Anderson *et al.*, 1988). Tôm sú nhiễm Vibriosis gắn liền với sự hình thành của "spheroids" trong các cơ quan lymphoid (Nash *et al.*, 1992).

Đối với mô gan tụy, kết quả phân tích cho thấy tôm sú ở nghiệm thức đối chứng âm (tôm khỏe) có tổ chức mô gan tụy vẫn còn nguyên với cấu trúc hình sao, có sự tồn tại tế bào B, F và R. Gan tụy tôm có cấu trúc gồm nhiều ống gan tụy kết hợp lại với nhau (Bell and Lightner, 1988; Bhavan and Geraldine, 2000), với 4 loại tế bào chính: tế bào E (tế bào phôi), tế bào B (tế bào dự trữ), tế bào R là tế bào chất đặc trưng chứa nhiều không bào nhỏ và giọt lipid, tế bào F (tế bào xơ) ưa kiềm (Wu *et al.*, 2008). Ở các nghiệm thức bổ sung chất chiết từ rong mơ với liều lượng 0%, 0,5%, 1% và 2% vào thức ăn thì cấu trúc mô gan tụy có sự biến đổi cho thấy sự xâm nhập của vi khuẩn cảm nhiễm *V. harveyi*, đặc biệt là nghiệm

thức không bổ sung (0%) và nghiệm thức bổ sung 2% chất chiết từ rong mơ. Tác động của vi khuẩn đến tế bào gan tụy bao gồm sự tập trung tế bào máu, sự xâm nhập của vi khuẩn giữa các ống gan tụy, ống gan tụy teo (Hình 4). Sự thay đổi cấu trúc này giống kết quả ghi nhận của Jiravanichpaisal *et al.* vào năm 1994 trong nghiên cứu về đặc điểm mô bệnh học của tôm sú khi cảm nhiễm với *V. harveyi*. Ngoài ra, nhóm tác giả Jiravanichpaisal *et al.* (1994) cũng ghi nhận rằng phân tích mô bệnh học khó có thể phân biệt các loài vi khuẩn khác nhau (*V. parahaemolyticus* hoặc *V. alginolyticus*) nhưng có biểu hiện khác biệt với tác nhân gây bệnh khác như virus (baculovirus) hay ký sinh trùng.

Đối với mô mang, ở nhóm tôm cảm nhiễm với *V. harveyi* cũng có sự khác biệt giữa các nghiệm thức bổ sung khác nhau. Trong đó, nghiệm thức không bổ sung và bổ sung 2% chất chiết từ rong mơ, sợi mang của tôm bị biến dạng co lại, mất liên kết (Hình 5) so với nghiệm thức bổ sung 0,5 và 1% chất chiết từ rong mơ. Sự biểu hiện này đồng nhất với kết quả mô bệnh học đã được ghi nhận trên mô gan tụy.



Hình 6: Sự thay đổi cấu trúc mô cơ của tôm sú ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* và cảm nhiễm với *V. harveyi*

(A, B, D) các bó cơ mất liên kết và (C) tập trung nhiều tế bào máu ở mô cơ

Mô cơ tôm sau khi cảm nhiễm với vi khuẩn phát sáng *V. harveyi*, đã có những biểu hiện về sự lây nhiễm và phá hủy bó cơ. Các bó cơ mất liên kết, biến dạng, làm đứt gãy, bong tróc các sợi cơ, đồng thời tập trung nhiều tế bào máu ở những vị trí có dấu hiệu xâm nhập hay gây hại của vi khuẩn (Hình 6). Đặc biệt, nghiệm thức tôm ăn thức ăn không bổ sung (0%) và nghiệm thức bổ sung 2% bổ sung chất chiết từ rong mơ biểu hiện rất rõ về sự tấn công làm phá

vỡ cấu trúc mô cơ của tôm cảm nhiễm. Qua đó cho thấy, tôm sú ăn thức ăn có bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* có khả năng tăng cường một số chỉ tiêu miễn dịch và giúp đề kháng với vi khuẩn *V. harveyi* tăng tỉ lệ sống.

4 KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

Tôm sú ăn thức ăn bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* với các hàm lượng khác nhau có sự

đáp ứng miễn dịch khác nhau sau 30 ngày, đặc biệt là có sự tăng cao so với nhóm đối chứng. Chế độ bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* 1% vào thức ăn có khả năng giúp tăng cường miễn dịch cho tôm sú bằng cách tăng cường chỉ số huyết học (tổng tế bào máu, bạch cầu có hạt, bạch cầu không hạt) và hoạt tính PO. Đồng thời, tôm sú ăn thức ăn bổ sung chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* 1% giúp gia tăng tỉ lệ sống lên 80% khi cảm nhiễm với vi khuẩn gây bệnh phát sáng *V. harveyi*. Sự ảnh hưởng của chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* lên tôm nuôi ở quy mô ao nuôi cần tiếp tục được khảo sát để có thể ứng dụng chất chiết từ rong mơ *S. microcystum* vào trong thực tế nghề nuôi trồng thủy sản.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện bởi sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài Khoa học và Công nghệ cấp Bộ - Mã số B2014-16-36, Bộ Giáo dục và Đào tạo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Anderson, I.G., Shamsudin M.N., and Shariff M., 1988. Bacterial septicemia in juvenile tiger shrimp, *Penaeus monodon*, cultured in Malaysian brackishwater ponds. *Asian Fisheries Science*. 2(1): 93-108.

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

Baticados, M.C.L., Lavilla-Pitogo C.R., Cruz-Lacierda E.R., de la Pena L.D. and Sunaz N.A., 1990. Studies on the chemical control of luminous bacteria *Vibrio harveyi* and *V. splendidus* isolated from diseased *Penaeus monodon* larvae and rearing water. *Dis. Aquat. Org.* 9(2): 133-139.

Bell, T.A., and Lightner D.V., 1988. *A Handbook of Normal Penaeid Shrimp Histology*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Bhavan, P.S., and Geraldine, P., 2000. Histopathology of the hepatopancreas and gills of the prawn *Macrobrachium malcolmsonii* exposed to endosulfan. *Aquatic Toxicology*. 50(4): 331-339.

Blondin, C., Fischer E., Boisson-Vidal C., Kazatchkine M.D., and Jozefonvicz J., 1994. Inhibition of complement activation by natural sulfated polysaccharides (fucoidans) from brown seaweed. *Molecular immunology*. 31(4): 247-253.

Burtin, P., 2003. Nutritional value of seaweeds. *Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food chemistry*. 2(4): 498-503.

Chayaburakul, K., Nash G., Pratanpipat P., Sriurairatana S., and Withyachumnarnkul B., 2004. Multiple pathogens found in growth-retarded black tiger shrimp *Penaeus monodon*

cultivated in Thailand. *Diseases of aquatic organisms*. 60(2): 89-96.

Chotigeat, W., Tongsupa S., Supamataya K., and Phongdara A., 2004. Effect of fucoidan on disease resistance of black tiger shrimp. *Aquaculture*. 233(1-4): 23-30.

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.

Cowley, J.A., Dimmock C.M., Spann K.M., and Walker P.J., 2012. Family Roniviridae. In: A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens and E.J. Lefkowitz (Eds.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, New York, 829-834.

Darcy-Vrillon, B., 1993. Nutritional aspects of the developing use of marine macroalgae for the human food industry. *Int J Food Sc Nutr*. 44: 23-35.

Herández-Lospez, T., Gollas-Galván S., and Vargas-Albores F., 1996. Activation of the prophenoloxidase system of the brown shrimp (*Penaeus californiensis* Holmes). *Comparative Biochemistry and Physiology-C-Pharmacology Toxicology Endocrinology*. 113(1): 61-66.

Huang, X., Zhou H., and Zhang H., 2006. The effect of Sargassum fusiforme polysaccharide extracts on vibriosis resistance and immune activity of the shrimp, *Fenneropenaeus chinensis*. *Fish Shellfish Immunol*, 20(5), 750-757.

Huỳnh Trường Giang, Dương Thị Hoàng Oanh, Vũ Ngọc Út và Trương Quốc Phú, 2013. Thành phần hóa học, hoạt tính chống oxy hóa của hỗn hợp polysaccharide ly trích từ rong mơ *Sargassum microcystum*. *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*. 25B: 183-191.

Immanuel, G., Sivagnanavelmurugan M., Marudhupandi T., Radhakrishnan S., and Palavesam A., 2012. The effect of fucoidan from brown seaweed *Sargassum wightii* on WSSV resistance and immune activity in shrimp *Penaeus monodon* (Fab). *Fish Shellfish Immunol*, 32(4): 551-64.

Jiravanichpaisal, P., and Miyazaki, T., 1994. Histopathology, biochemistry and pathogenicity of *Vibrio harveyi* infecting black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 6(1): 27-35.

Jiravanichpaisal, P., Lee B.L., and Soderhall K., 2006. Ceel-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, 211(4): 213-236.

Kanjana, K., Rattanapit T., Asuvapongpatana S., Withyachumnarnkul B., and Wongprasert K., 2011. Solvent extracts of the red seaweed *Gracilaria fisheri* prevent *Vibrio harveyi* infections in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Fish Shellfish Immunol*. 30(1): 389-396.

- Kitikiew, S., Chen J.C., Putra D.F., Lin Y.C., Yeh S.T., and Liou C.H., 2013. Fucoidan effectively provokes the innate immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against experimental *Vibrio alginolyticus* infection. *Fish Shellfish Immunol.* 34(1): 280-290.
- Lavilla-Pitogo, C.R., Baticados M.C.L., Cruz-Lacierda E.R., and Dela-Pena L.D., 1990. Occurrence of luminous bacterial disease of *Penaeus monodon* larvae in the Philippines. *Aquaculture.* 91(1-2): 1-13.
- Le Moullac, G., Klein B., Sellos D., and VanWormhoudt A., 1997. Adaptation of trypsin, chymotrypsin and α -amylase to casein level and protein source in *Penaeus vannamei* (Crustacea Decapoda). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,* 208(1-2): 107-125.
- Lightner, D.V., 1996. A handbook of shrimp pathology and diagnostic procedure for diseases of culture penaeid shrimp. Word Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, LA.
- Lin, Y.C., Yeh S.T., Li C.C., Chen L.L., Cheng A.C., and Chen J.C., 2011. An immersion of *Gracilaria tenuistipitata* extract improves the immunity and survival of white shrimp *Litopenaeus vannamei* challenged with white spot syndrome virus. *Fish & Shellfish Immunology.* 31(6): 1239-1246.
- Liu, L., Heinrich M., Myers S., and Dworjanyan S.A., 2012. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: A phytochemical and pharmacological review. *Journal of Ethnopharmacology.* 142(3): 591-619.
- Liu, P.C., Lee K.K., Yui K.C., Kou G.H. and Chen S.N., (1996). Isolation of *Vibrio harveyi* from diseased kuruma prawns *Penaeus japonicus*. *Curr. Microbiol.* 33(2): 129-132.
- Lo, C.F., Aoki T., Bonami J.R., et al., 2012. Nimaviridae. In: A.M.Q. King, M.J. Adams, E.B. Carstens and E.J. Lefkowitz (Eds.). *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier, New York, 229-234.
- Loc, T, L. Nunan, Redman R.M., et al., 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.
- Nash, G., Nithimathachoke C., Tungmandi C., Arkarjamorn A., Prathanpipat P., and Ruamthaveesub P., 1992. Vibriosis and its control in pond-reared *Penaeus monodon* in Thailand. In: M. Shariff, R.P. Subasinghe and J.R. Authur (Eds.). *Diseases in Asian Aquaculture 1.* Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. 143-155.
- Pantakar, M.S., Oehninger S., Barnett T., Williams R.L., and Clark G.F., 1993. A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *Journal of Biological Chemistry.* 268(29): 21770- 21776.
- Robertson, P.A.W., Calderon J., Carrera L., Stark J.R., Zherdmant M. and Austin B., 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus Vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms.* 32(2): 151-155.
- Sánchez-Machado, D.I, López-Hernández J., and Paseiro-Losada P., 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. *Food Chem.* 85(3): 439-444.
- Sivagnanavelmurugan, M., Thaddaeus B.J., Palavesam A., and Immanuel G., 2014. Dietary effect of *Sargassum wightii* fucoidan to enhance growth, prophenoloxidase gene expression of *Penaeus monodon* and immune resistance to *Vibrio parahaemolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology.* 39(2): 439-449.
- Sun, K., Hu Y.H., Zhang X.H., Bi F.F., and Sun L., 2009. Identification of *vhhP2*, a novel genetic marker of *Vibrio harveyi*, and its application in the quick detection of *V. harveyi* from animal specimens and environmental. *Applied Microbiology,* 107(4): 1251-1257.
- Takahashi, Y., Uehara K., Watanabe R., Okumura T., Yamashita T., and Omura H., 1998. Efficacy of oral administration of fucoidan, a sulfated polysaccharide, in controlling white spot syndrome in kuruma shrimp in Japan. In: Flegel T.W. (editor). *Advances in shrimp biotechnology.* Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 171-174.
- Tangprasittipap, A., Srisala J., Chouwddee S., et al., 2013. The microsporidian Enterocytozoon hepatopenaei is not the cause of white feces syndrome in whiteleg shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *BMC Vet. Res.,* 9, 139.
- Thitamadee, S., Prachumwat A., Srisala J., et al., 2016. Review of current disease threats for cultivated penaeid shrimp in Asia, 2016. *Aquaculture.* 452 : 69-87.
- Traifalgar, R.F.M., Corre V.L., and Serrano A.E., 2013. Efficacy of Dietary Immunostimulants to Enhance the Immunological Responses and Vibriosis Resistance of Juvenile *Penaeus monodon*. *Journal of Fisheries and Aquatic Science,* 8(2): 340-352.
- Wu, J., Chen H., and Huang D., 2008. Histopathological and biochemical evidence of hepatopancreatic toxicity caused by cadmium and zinc in the white shrimp, *Penaeus vannamei*. *Chemosphere.* 73(7): 1019-1026.
- Zhang, Q., Liu Q., Liu S., et al., 2014. A new nodavirus is associated with covert mortality disease of shrimp. *J. Gen. Virol.* 95(12): 2700-2709.
- Zhuang, C., Itoh H., Mizuno T., and Ito H., 1995. Antitumor active fucoidan from the brown seaweed, Umitoranoo (*Sargassum thunbergii*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.* 59(4): 563-567.