

ỨNG DỤNG MỘT SỐ CHẤT KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

Võ Trọng Thắng^{1*}, Nguyễn Thị Tài²

¹Phòng Nghiên cứu nguồn lợi hải sản, Viện Nghiên cứu Hải sản

²Trung tâm Khuyến nông Hải Phòng

* Email: vtthanghua@gmail.com

Ngày nhận bài: 03/12/2022

Ngày nhận bài sửa sau phản biện: 12/01/2023

Ngày chấp nhận đăng: 03/02/2023

TÓM TẮT

Trong nuôi trồng thủy sản, chất kích thích miễn dịch kích hoạt hệ thống miễn dịch của động vật thủy sản và tăng cường khả năng kháng bệnh của chúng. Bổ sung chất kích thích miễn dịch vào trong thức ăn thủy sản đã góp phần cải thiện chất lượng con giống và năng suất nuôi trồng. Các chất kích thích miễn dịch dần được dùng phổ biến với mục đích nâng cao sức đề kháng, phòng ngừa dịch bệnh và tăng trưởng. Ngày nay có nhiều chất kích thích miễn dịch được dùng để thay thế các chất kháng sinh, giảm hiện tượng kháng kháng sinh và tồn dư kháng sinh trong các sản phẩm thủy sản, đảm bảo an toàn thực phẩm. Bài viết này tóm tắt thông tin về chức năng, vai trò và ứng dụng một số chất kích thích miễn dịch, nhằm cung cấp một số thông tin khoa học định hướng cho việc nghiên cứu và sử dụng hiệu quả các chất kích thích miễn dịch trong nuôi trồng thủy sản.

Từ khóa: chất kích thích miễn dịch, miễn dịch, nuôi trồng thủy sản.

APPLICATION OF IMMUNOSTIMULANTS IN AQUACULTURE

ABSTRACT

In aquaculture, immunostimulants activate the immune system of aquatic animals and enhance their disease resistance. The supplements of immunostimulants into aquatic feed have contributed to improving seed quality and production. Immunostimulants are now widely used for the aim of improving resistance, disease prevention and growth. They are now frequently used as alternatives for antibiotics, assisting in reducing antibiotic abuse in aquaculture, residues antibiotics in aquatic products, and ensuring food safety. In order to provide some scientific guidance for the research and efficient application of immunostimulants in aquaculture, this article will provide a summary of information on the purpose, role, and application of some immunostimulants.

Keywords: aquaculture, immunity, immunostimulant.

1. MỞ ĐẦU

Môi trường thủy sinh toàn cầu đã và đang bị tàn phá do sự phát triển nhanh của các ngành công nghiệp. Từ đó phát sinh nhiều vấn

đề, đặc biệt là chất lượng nước ngày càng suy thoái và dịch bệnh thủy sản đã trở thành mối đe dọa đối với sự phát triển của ngành nuôi trồng thủy sản (NTTS) (Winton, 2001). Việc

sử dụng các chất kháng sinh trong NTTS để điều trị các dịch bệnh ngày càng tăng cao về liều lượng và quy mô, dẫn tới sự tồn dư các chất kháng sinh trong các sản phẩm thủy sản và cũng là một trong những nguyên nhân gây ra hiện tượng kháng thuốc. Bên cạnh đó, việc nuôi thâm canh nhằm giảm thiểu chi phí và tăng sản lượng thường dẫn đến tình trạng quá tải trong hệ thống nuôi. Điều này gây ra các yếu tố stress cho động vật thủy sản (ĐVTS) và làm giảm khả năng miễn dịch của chúng, khiến chúng dễ mắc bệnh. Theo Tổng cục Thủy sản (2022), đến hết tháng 5 năm 2022, diện tích NTTS bị dịch bệnh khoảng 1.200 ha, cụ thể: (i) Diện tích tôm nuôi bị dịch bệnh là 978 ha, chủ yếu là bệnh đốm trắng và hoại tử gan tụy cấp tính (tăng 22% so với cùng kỳ năm 2021); (ii) Diện tích cá tra nuôi bị mắc bệnh 153 ha (giảm 27% so với cùng kỳ năm 2021), chủ yếu do mắc các bệnh gan thận mũ, xuất huyết, ký sinh trùng, một số bị sưng bóng hơi, phù đầu và tuột nhớt. Ngoài ra, khoảng 50 ha và 406 bè, vèo/giai thủy sản tại An Giang, Đồng Tháp, Bến Tre bị mắc một số bệnh thông thường (cá điều hồng, cá lóc, cá nạng hai bị xuất huyết, ký sinh trùng và phù đầu; ếch bị xuất huyết, chướng hơi, lở loét). Để giảm bớt tình trạng này, yêu cầu đặt ra phải có các biện pháp, liệu pháp thay thế, đảm bảo có lợi cho môi trường thủy sinh và không ảnh hưởng tới sức khỏe con người và vật nuôi như vắc-xin, thực khuẩn thể, kháng sinh thực vật và các chất kích thích miễn dịch (Quesada & cs., 2013; Siriyappagouder & cs., 2014). Một trong những biện pháp đó là đưa chất kích thích miễn dịch vào thức ăn để tăng cường khả năng miễn dịch của ĐVTS, cải thiện sức kháng bệnh, giúp chúng tăng trưởng và cho sản lượng tốt hơn trong những năm gần đây (Chieng & cs., 2018).

Các chất kích thích miễn dịch với ưu thế dễ sử dụng, giá thành hợp lý ... nên đã được sử dụng rộng rãi trong các trang trại để tăng cường sức đề kháng cho các đối tượng thủy sản. Dựa trên nghiên cứu của các nhà khoa học trong nước và trên thế giới, bài viết này trình bày vai trò, ứng dụng của chất kích

thích miễn dịch, sự kết hợp của các chất kích thích miễn dịch sử dụng trong thức ăn thủy sản, phòng chữa bệnh. Đồng thời làm rõ phương thức, liều lượng, tác dụng và các yếu tố ảnh hưởng đến chất kích thích miễn dịch trong quá trình sử dụng. Đây là cơ sở để có nhiều ứng dụng các chất kích thích miễn dịch trong NTTS, và là cơ sở cho các nghiên cứu để tạo nên các hợp chất mới kích thích miễn dịch mới, góp phần phòng chống dịch bệnh hiệu quả và hạn chế tình trạng sử dụng kháng sinh đang gây ra nhiều hệ lụy như kháng kháng sinh và tồn dư kháng sinh trong các sản phẩm thủy sản như hiện nay.

2. MỘT SỐ CHẤT KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH THƯỜNG DÙNG TRONG NUÔI TRỒNG THỦY SẢN

2.1. β -glucan

Các chất polysaccharide đã được dùng phổ biến từ những năm 1960, thường sử dụng với ba phương thức trong NTTS: Ngâm, tiêm trực tiếp vào ĐVTS và sử dụng làm phụ gia thức ăn cho ĐVTS (Rashidian, 2019). β -glucan là một chất kích thích miễn dịch thuộc nhóm polysaccharide cấu thành trong thành tế bào của nhiều sinh vật bao gồm vi khuẩn, nấm men, nấm sợi, cũng như thực vật; tuy nhiên, nó không có ở động vật có xương sống (Kottom & Limper, 2000). β -glucan được tìm thấy ở nấm sợi và nấm men, có sự khác biệt với chất kích thích miễn dịch có nguồn gốc từ vi khuẩn về cả cấu trúc hóa học và phương thức hoạt động (Stier & cs., 2014). Vị trí liên kết của các monosaccharide trong chuỗi đã hình thành nên những hợp chất với tên gọi khác nhau như là: agar (β -1,3-1,4-glucan), alginate (β -1,4 glucan), carrageenan (β -1,3-1,4-glucan) (Wood, 1974), fucoidan (β -1,3-glucan), laminarin (β -1,3-1,6-glucan) (Davis & cs., 2003) (Hình 1).

Trong NTTS, β -glucan thường được sử dụng như là chất kích thích hệ thống kháng thể để bảo vệ vật nuôi khỏi dịch bệnh (Siwicki & cs., 1994). β -glucan kích hoạt các tế bào thực bào ở cá, cải thiện khả năng thực bào để tiêu diệt mầm bệnh, giảm hệ số chuyển đổi thức ăn, kích thích tiêu hóa, phòng các loại bệnh đường ruột, nhiễm trùng do vi khuẩn, virus; tăng cường sức đề kháng,

kích thích và tăng cường hệ miễn dịch bẩm sinh, tác động tích cực đến năng suất, tăng tỷ lệ sống và làm lành vết thương diễn ra nhanh chóng. Ngoài ra, chúng còn được sử dụng kết hợp với một số loại vắc-xin tiêm cho cá biển.

β -glucan đã được xác định là chất kích thích miễn dịch có khả năng tăng cường miễn dịch của nhiều loài thủy sản như tôm thẻ chân trắng (*Litopenaeus vannamei*) (Bai & cs., 2010), tôm sú (*Penaeus monodon*) (Suphantharika & cs., 2003), cá hồng (*Pagrus auratus*) (Cook & cs., 2003) và cá chép (*Cyprinus carpio*) (Pionnier & cs., 2014). Theo Huỳnh Trường Giang và cộng sự (2011) có nhiều nghiên cứu ứng dụng β -glucan thành công trong việc tăng cường miễn dịch đối với vi khuẩn gây bệnh thuộc nhóm *Vibrio*, thậm chí đối với virus đốm trắng trên một số loài tôm biển như tôm sú, tôm he Nhật Bản (*Marsupenaeus japonicas*), tôm thẻ chân trắng, tôm he Ấn Độ (*Fenneropenaeus chinensis*), tôm thẻ chân vàng (*Farfantepenaeus californiensis*), và tôm Sao Paulo (*Farfantepenaeus paulensis*). Mai và cộng sự (2019) trong quá trình nghiên cứu tốc độ tăng trưởng ở cá chép đã chỉ ra rằng khi sử dụng dầu thực vật kết hợp β -glucan bổ sung 0,25 g/kg trong thức ăn đã tăng cường sức đề kháng và kích thích hệ miễn dịch tốt ở cá chép.

β -glucan đã được chứng minh làm tăng khả năng kháng nhiều bệnh ở ĐVTS như kháng *Edwardsiella tarda* ở cá chép (Yano & cs., 1991), *Aeromonas hydrophila* ở cá da trơn (*Clarias batrachus*) (Kumari & Sahoo, 2006) và *Flavobacterium columnare* ở cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) (Kunttu & cs., 2009), cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) (Kim Văn Vạn & cs., 2021). Amphan và cộng sự (2019) đã nghiên cứu chế độ cho ăn tối ưu theo tuần của β -glucan để nâng cao khả năng miễn dịch bẩm sinh và tăng khả năng chống lại sự lây nhiễm của vi khuẩn gây bệnh ở cá rô phi sông Nile. Tác giả đã chỉ ra rằng chế độ ăn bổ sung β -glucan cách tuần vừa tiết kiệm chi phí vừa tăng cường khả năng miễn dịch bẩm sinh ở cá rô phi, đồng thời tăng cường khả năng kháng bệnh chống lại *Aeromonas hydrophila* và *Flavobacterium columnare*. Ở giai đoạn ương cá rô phi giống

(1g/con), Kim Văn Vạn và cộng sự (2021) đã xác định được khi bổ sung β -glucan vào thức ăn đã tăng cường sức đề kháng, chống lại bệnh bệnh bạc da, trắng đuôi do vi khuẩn *Flavobacterium columnare* gây ra.

Hơn nữa, việc áp dụng β -glucan vào thức ăn ĐVTS có tác động tích cực đến năng suất sinh trưởng và tăng tỷ lệ sống ở nhiều loài thủy sản như ở cá rô hu (*Labeo rohita*) (Misra & cs., 2006) và cá vược vàng lớn (*Pseudosciaena crocea*) (Ai & cs., 2007). Diệp Tuấn Em (2012) khi bổ sung β -glucan vào thức ăn trong nuôi cá rô đầu vuông (*Anabas testudineus*) giai đoạn giống với liều lượng 1,6 g/kg thức ăn cho kết quả tăng trưởng về chiều dài và khối lượng cao nhất đạt 6,85 cm và 10,1g sau 4 tuần thí nghiệm và tỷ lệ sống của cá đạt cao nhất 75,8% ở nghiệm thức bổ sung β -glucan vào thức ăn với liều lượng 3,2 g/kg thức ăn so với nghiệm thức đối chứng 46,7%. Ở cá lóc bông (*Channa micropeltes*) giai đoạn từ 20-55 ngày tuổi, khi bổ sung β -glucan vào thức ăn với liều lượng 0,5% β -glucan trong thức ăn cho kết quả tăng trưởng về khối lượng và chiều dài cao nhất lần lượt là 166 mg/ngày và 1,22 mm/ngày. Nhưng tỷ lệ sống của cá đạt cao nhất lại là nghiệm thức bổ sung 0,2% β -glucan trong thức ăn với 92,2%, cao hơn 40% so với tỷ lệ sống của nghiệm thức đối chứng (Nguyễn Thị Kim Nguyệt, 2012). Kim Văn Vạn và cộng sự (2021) khi bổ sung β -glucan vào thức ăn cá rô phi giống sau 2 tuần đã xác định được thức ăn bổ sung β -glucan có tốc độ sinh trưởng (0,235g/con/ngày) cao hơn và FCR (0,93) thấp hơn so với lô đối chứng là 0,228 g/con/ngày và 0,95.

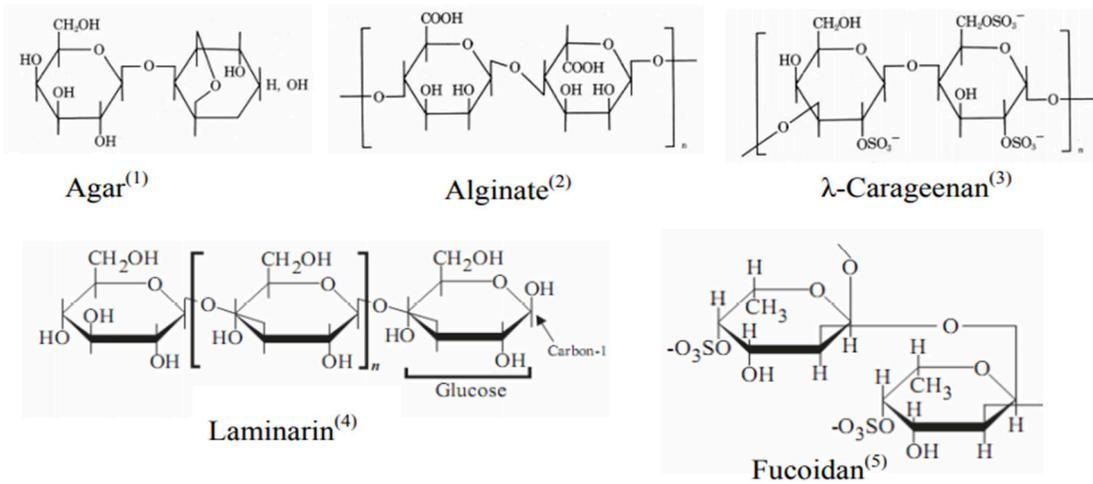
Ngoài các ứng dụng trên, β -glucan còn được sử dụng để chữa lành vết thương cho ĐVTS, một hướng đi mới có thể thay thế kháng sinh trong tương lai. Nhóm tác giả Dos Santos Voloski và cộng sự (2019) sử dụng β -glucan tắm cho cá da trơn bị thương cho thấy việc chữa lành vết thương diễn ra nhanh chóng và cải thiện đáng kể bằng cách tắm cá da trơn hàng ngày với β -glucan. β -glucan còn được sử dụng kết hợp với một số loại vắc-xin tiêm cho cá biển, cho thấy chúng giống như một chất bổ trợ cho vắc-xin như nghiên cứu của Wei và cộng sự (2020) đã chứng minh rằng β -glucan

có thể là một chất bổ trợ tiềm năng của FKC (vắc-xin *Vibrio harveyi* ZJ0603) và cung cấp tác dụng bảo vệ, chống lại sự lây nhiễm *Vibrio harveyi* trong nuôi cá mú.

2.2. Chitosan

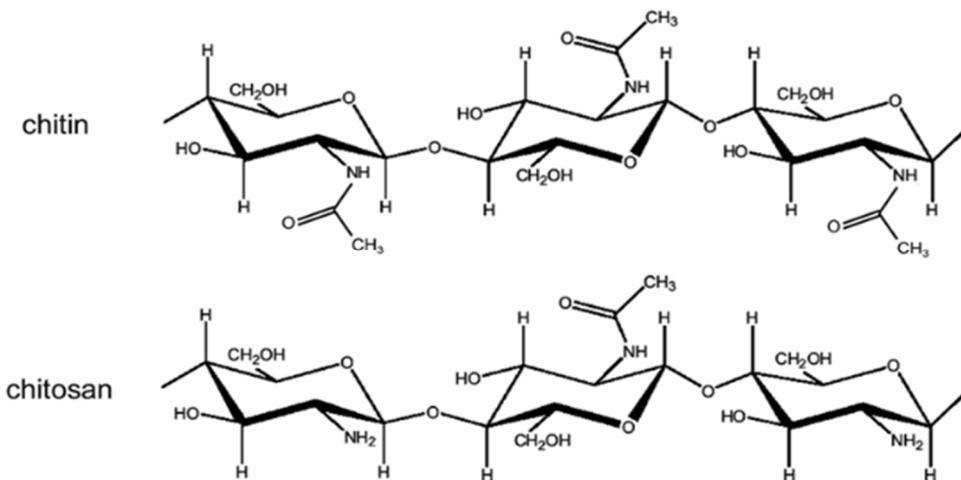
Chitosan là một polysaccharide kiềm, mạch thẳng, được tìm thấy trong vỏ của động vật thủy sinh như tôm, cua, mai mực. Chitosan được thu từ quá trình khử oxy hóa chitin, một chuỗi polymer dài của N-acetylglucosamine (Hình 2) (Orzali & cs., 2017). Đây là một chất kích thích miễn dịch được tìm thấy trong vật liệu tự nhiên, tương thích

sinh học. Nó là một chất có hoạt tính kháng ký sinh trùng, kháng khuẩn, có khả năng kích thích miễn dịch và tự phân hủy sinh học cao, không gây dị ứng, không gây độc hại cho người và vật nuôi và thường được sử dụng như nguồn dược liệu quý trong nuôi thủy sản (Polk & cs., 1994). Chức năng chính của Chitosan là tăng cường khả năng miễn dịch bẩm sinh, kích thích tăng trưởng và giảm tỷ lệ chết ở ĐVTS (Gopalakannan & Arul, 2006), cải thiện khả năng miễn dịch ĐVTS (Li & cs., 2009), ức chế sự phát triển mầm bệnh và tăng cường sức kháng bệnh của động vật thủy sinh (Hua & cs., 2007).



(Nguồn: Wood, 1974; Davis, 2003)

Hình 1. Cấu trúc các hợp chất β-glucan.



(Nguồn: Orzali & cs., 2017)

Hình 2. Cấu trúc phân tử của Chitin (β(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine) và Chitosan (β(1-4)-D-glucosamine).

Đây là một chất kích thích miễn dịch được tìm thấy trong vật liệu tự nhiên, tương thích sinh học. Nó là một chất có hoạt tính kháng ký sinh trùng, kháng khuẩn, có khả năng kích thích miễn dịch và tự phân hủy sinh học cao, không gây dị ứng, không gây độc hại cho người và vật nuôi và thường được sử dụng như nguồn dược liệu quý trong nuôi thủy sản (Polk & cs., 1994). Chức năng chính của Chitosan là tăng cường khả năng miễn dịch bẩm sinh, kích thích tăng trưởng và giảm tỷ lệ chết ở ĐVTS (Gopalakannan & Arul, 2006), cải thiện khả năng miễn dịch ĐVTS (Li & cs., 2009), ức chế sự phát triển mầm bệnh và tăng cường sức kháng bệnh của động vật thủy sinh (Hua & cs., 2007).

Các nghiên cứu ứng dụng Chitosan lên khả năng tăng cường hệ miễn dịch và nâng cao tỷ lệ sống trên một số đối tượng như cá chép, cá hồi, cá tra, tôm... Cụ thể ở cá chép, Gopalakannan & Arul (2006) đã cho cá ăn Chitosan trong thời gian 90 ngày và sau đó được cảm nhiễm với mầm bệnh *Aeromonas hydrophila* ở ngày thứ 45 cho tỷ lệ sống đạt 80% và giảm xuống còn 68,9% ở ngày 90. Kết quả chỉ ra rằng, chế độ ăn bổ sung chitosan giúp tăng cường hệ miễn dịch và tăng tỷ lệ sống của cá chép. Bùi Thị Bích Hằng & Nguyễn Hoàng Vũ, (2019) khi thử nghiệm ảnh hưởng của thức ăn có bổ sung Chitosan lên một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu ở cá tra đã xác định bổ sung Chitosan vào thức ăn sẽ kích thích đáp ứng miễn dịch của cá, đồng thời có thể tạo ra lớp phòng vệ cho cá tra chống lại tác nhân gây bệnh gan thận mũ do vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri*. Từ đó nhóm tác giả khuyến cáo bổ sung Chitosan vào thức ăn cá ở liều 1% sẽ mang lại hiệu quả kích thích miễn dịch và phòng bệnh gan thận mũ cao nhất. Mari và cộng sự (2014) thí nghiệm bổ sung 1% Chitosan vào thức ăn cá mrigala (*Cirrhinus mrigala*), sau đó cảm nhiễm cá thí nghiệm với *Aphanomyces invadans*. Kết quả cho thấy các chỉ tiêu huyết học, hoạt tính thực bào, lysozym và bổ thể đều tăng cao ở các nghiệm thức bổ sung Chitosan. Tỷ lệ chết của cá ở nghiệm thức có bổ sung 1% Chitosan là 10% thấp hơn so với nghiệm thức đối chứng (25%). Thí nghiệm bổ sung Chitosan với các

hàm lượng 0; 5; 10; 20 g/kg thức ăn cho cá chẽm và gây cảm nhiễm với *Vibrio anguillarum*. Kết quả cũng ghi nhận nghiệm thức bổ sung Chitosan 10 g/kg thức ăn có tỉ lệ chết thấp nhất là 25% (Ranjan & cs., 2014). Nghiên cứu khác trên tôm thẻ chân trắng, khi tiêm Chitosan với liều lượng 2; 4 và 6 µg/g, tiếp đó tôm được gây nhiễm với mầm bệnh *Vibrio alginolyticus*. Kết quả cho thấy tỷ lệ sống của tôm được sử dụng Chitosan ở cả ba liều lượng đều cao hơn đáng kể so với tôm đối chứng sau 1 ngày và khi kết thúc thử nghiệm (6 ngày sau thử nghiệm) (Wang & Chen, 2005).

Sử dụng Chitosan bổ sung trong thức ăn vừa nâng cao sinh trưởng, vừa tăng sức kháng bệnh cho ĐVTS, từ đó giảm được thời gian nuôi và thiệt hại do dịch bệnh gây ra. Trong một thí nghiệm thực tế, cá rô phi sông Nile cho ăn chitosan 1 g/kg thức ăn trong 3 tuần và sau đó cảm nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Streptococcus agalactiae* và *Staphylococcus aureus*. Người ta nhận thấy rằng, cá ở chế độ ăn giàu Chitosan cho thấy tỷ lệ chết ít hơn (từ 6,7-20%), trong khi cá ở chế độ ăn không có chitosan cho thấy tỷ lệ chết cao nhất (từ 66,7-100%). Tác giả kết luận, chế độ ăn bổ sung Chitosan đã tăng cường tính kháng bệnh, bảo vệ cá rô phi sông Nile một cách hiệu quả chống lại nhiễm trùng *A. hydrophila*, *A. sobria* và *S. agalactiae* là 93,3%, và *S. aureus* là 70% (Abdel-Razek, 2019). Ngoài ra, Chitosan còn có khả năng kết hợp với Vitamin nhằm tăng thời hạn sử dụng thức ăn, cải thiện khả năng miễn dịch và vi sinh vật có lợi tăng cường sức kháng bệnh của ĐVTS. Nghiên cứu của Alishahi và cộng sự (2011) cho thấy Chitosan có khả năng kết hợp Vitamin C đã làm tăng thời hạn sử dụng thức ăn và giữ được hàm lượng Vitamin C trong thức ăn cá hồi vãn 20 ngày. Các tác giả cũng cho thấy hàm lượng Vitamin C tăng đáng kể ($p < 0,05$) trong thức ăn cá hồi vãn trong 20 ngày ở môi trường nhiệt độ phòng, trong khi lô đối chứng, thức ăn có Vitamin C không kết hợp Chitosan hàm lượng Vitamin C mất đáng kể trong vài ngày ở nhiệt độ phòng. Các tác giả cũng cho thấy rằng Chitosan kết hợp Vitamin C trong thức ăn tạo ra hệ thống miễn dịch không đặc hiệu ở cá hồi vãn. Nhóm nghiên cứu

của Lin và cộng sự (2012) đã kết hợp Chitosan với *Bacillus coagulans* trộn vào thức ăn cá chép Koi (*Cyprinus carpio* Koi) và cho cá ăn trong 8 tuần, sau đó cảm nhiễm cá thí nghiệm với vi khuẩn *Aeromonas veronii*. Kết quả cho thấy nghiệm thức kết hợp bổ sung Chitosan và *B. coagulans* thể hiện khả năng đề kháng với vi khuẩn *A. veronii* ở mức cao, có ý nghĩa thống kê so với các nghiệm thức chỉ có *B. coagulans*.

2.3. Vitamin

Vitamin là hợp chất hữu cơ cần thiết cho sự phát triển bình thường, sinh sản, trao đổi chất và miễn dịch (Amlashi & cs., 2011; Ai & cs., 2004). Vitamin bao gồm 2 nhóm là Vitamin tan trong nước và Vitamin tan trong chất béo. Hiện tại, Vitamin C và Vitamin E được sử dụng như là một chất kích thích miễn dịch cho ĐVTS (Wang & cs., 2017).

Trong số các loại Vitamin, tầm quan trọng của Vitamin C đã được chứng minh trong NTTS. Nó tham gia vào quá trình tổng hợp hormone steroid và collagen (Cavalli & cs., 2003), khả năng chống chịu với độc tố và các tác nhân gây stress từ môi trường (Merchie & cs., 1995). Vitamin C (axit ascorbic) cần thiết cho sự phát triển bình thường và chức năng sinh lý của hầu hết các loài ĐVTS, giảm stress, nâng cao tốc độ tăng trưởng (Dawood & Koshio, 2018). Vitamin C nằm trong danh sách chất miễn dịch tự nhiên cho cơ thể cá và tôm, có tính chất kích thích miễn dịch và đáp ứng miễn dịch. Chúng bảo vệ hệ thống miễn dịch cho cá và tôm bằng cách tăng cường hoạt động của các tế bào miễn dịch bao gồm bạch cầu trung tính và đại thực bào, ngăn chặn vi khuẩn bám vào tế bào biểu mô. Bùi Thị Bích Hằng và cộng sự (2015) đã thử nghiệm cá tra giống (15-20 g/con) cho ăn với thức ăn có bổ sung nhiều mức Vitamin C (0, 50, 500 và 1000 mg/kg thức ăn) trong 4 tuần. Kết quả cho thấy bổ sung Vitamin C ở mức 500-1000 mg/kg thức ăn kích thích gia tăng một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu và tăng khả năng kháng vi khuẩn (*A. hydrophila* và *E. ictaluri*) bảo vệ cá tra.

Vitamin E có vai trò quan trọng trong việc duy trì sự trao đổi chất và chức năng sinh lý bình thường ở động vật. Qiang và cộng sự (2019) đã chỉ ra rằng, thiếu hụt Vitamin E gây ức chế sự phát triển, suy giảm chuyển hóa

chất béo và làm giảm sức đề kháng của cá rô phi giống dòng GIFT, tuy nhiên nếu bổ sung Vitamin E vào chế độ ăn hàng ngày những tác động tiêu cực này sẽ bị loại bỏ. Yêu cầu tối thiểu đối với Vitamin E (α -tocopherol) trong thức ăn cá rô phi dựa trên tăng trưởng đã được xác định là 20-40 mg/kg thức ăn. Tuy nhiên, liều lượng ăn cao hơn (trên 550 mg/kg) có thể cải thiện hơn nữa tính kết dính, khả năng phục hồi, kết cấu thịt và khả năng chống oxy hóa trong huyết thanh của cá rô phi. Đối với giai đoạn cá rô phi giống dòng GIFT bổ sung Vitamin E với liều lượng 160-320 mg/kg giúp tăng hàm lượng Vitamin E trong mô cá, đồng thời kích hoạt đáp ứng miễn dịch, tăng khả năng kháng khuẩn.

Một số Vitamin khác cũng được sử dụng trong NTTS, chúng đã được chứng minh vai trò thúc đẩy tăng trưởng, tăng cường sức đề kháng và giảm tỷ lệ chết ở ĐVTS. Nghiên cứu của He và cộng sự (1992) đã kiểm tra sự tăng trưởng và tỷ lệ sống trên tôm thẻ chân trắng trong 8 tuần khi cho ăn với Vitamin A, D, E và K. Kết quả cho thấy tôm tăng trưởng tốt (tăng 72,8% so với đối chứng) khi thức ăn được bổ sung Vitamin A, D, E và K. Tỷ lệ sống của tôm được cho ăn Vitamin A, D và K không khác so với đối chứng. Phần lớn tôm được cho ăn không bổ sung Vitamin E có biểu hiện gan tụy sẫm màu mà không thấy ở các nghiệm thức khác. Tình trạng kém ăn được quan sát thấy ở các nhóm tôm cho ăn thiếu Vitamin D. Kết quả nghiên cứu này cho thấy Vitamin A, D và E là những chất dinh dưỡng thiết yếu trong khẩu phần ăn của tôm.

2.4. Các axit hữu cơ và muối

Việc sử dụng các axit hữu cơ bổ sung vào khẩu phần thức ăn ĐVTS đã trở thành trọng tâm của nhiều nghiên cứu và sản xuất thức ăn thương mại gần đây. Do vậy, axit hữu cơ hoặc muối tương ứng của chúng là một chất thay thế tiềm năng cho kháng sinh để kích thích tăng trưởng trong thức ăn thủy sản. Các axit hữu cơ hoặc muối của axit hữu cơ bổ sung vào thức ăn thủy sản thường bao gồm axit lactic và sodium lactate, axit acetic và sodium acetate, axit propionic và sodium propionate, axit formic và sodium formate hay potassium diformat (Wing-Keong & Chik-Boon, 2017).

Các axit hữu cơ như: Axit citric, sodium citrate, axit formic, potassium hay sodium diformate, axit lactic, sodium lactate, axit propionic, calcium propionate có thể cải thiện việc sử dụng protein và khoáng chất, giúp tăng tăng trưởng và hiệu quả sử dụng thức ăn, đồng thời giảm tỷ lệ chết khi cá bị nhiễm bệnh. Điều này được thể hiện rõ khi sử dụng potassium diformate bổ sung vào thức ăn nuôi cá rô phi trong 85 ngày ở Indonesia cho thấy potassium diformate trộn vào thức ăn theo tỷ lệ 0,2% đã giúp cá ăn nhiều thức ăn hơn, tăng trưởng nhanh hơn 20% và có FCR thấp hơn 8% so với nhóm đối chứng. Đặc biệt khi cảm nhiễm vi khuẩn *Vibrio anguillarum* (vi khuẩn gây bệnh xuất huyết, đốm đỏ, lở loét, mòn vây) ở mức 105 CFU/ngày, trong 20 ngày thì tỷ lệ chết của cá là 20,8% ở nhóm bổ sung potassium diformate, còn ở nhóm đối chứng cá có tỷ lệ chết tới 33%. Hàm lượng potassium diformate càng cao thì tỷ lệ chết càng giảm (hàm lượng potassium diformate là 0,3% và 0,5% thì tỷ lệ chết của cá lần lượt là 18,4% và 11%) (Situmorang, 2015). Một báo cáo khác về sử dụng potassium diformate cho giai đoạn cá rô phi giống (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis aureus*) 2,7 g/con, trong 56 ngày cho thấy cá ăn khẩu phần chứa 0,3% potassium diformate đã cho tăng trưởng cao hơn 11,6% so với cá ăn thức ăn không bổ sung axit hữu cơ (Zhou & cs., 2009).

Bổ sung axit hữu cơ trong thức ăn thủy sản được coi là một trong những biện pháp hiệu quả để phòng bệnh, thúc đẩy tăng trưởng và giảm tỷ lệ chuyển đổi thức ăn (FCR) từ đó kháng sinh được loại bỏ khỏi khẩu phần ăn của ĐVTS. Với các thí nghiệm trên cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) ở giai đoạn cá hương, tăng trưởng và FCR của cá được cải thiện rõ rệt khi nuôi bằng thức ăn bổ sung từ 1,0-1,5% muối của axit formic hay của axit succinic. Thức ăn bổ sung muối của các axit hữu cơ này cũng cho thấy chúng có khả năng thay thế kháng sinh flavomycin (Lim & cs., 2015). Ngoài ra, axit hữu cơ có thể điều chỉnh quần thể vi khuẩn trong ruột trước của cá bằng cách tiêu diệt vi khuẩn gram âm gây bệnh. Điều này thường giúp cải thiện hệ vi sinh đường ruột và có thể giảm thiểu sự bùng phát của vi khuẩn gây bệnh. Bổ sung 0,2 đến 0,5% kali

differormate trong thức ăn giúp cải thiện khả năng giữ protein, tăng trưởng của cá rô phi (Elala & Ragaa, 2015). Các axit hữu cơ giúp giảm số lượng vi khuẩn gram âm gây bệnh như *Vibrio anguillarum* và *A. hydrophilla* trong phân và biểu mô ruột.

Đặc biệt, các nghiên cứu sử dụng các axit hữu cơ để ức chế các vi khuẩn gây bệnh trên tôm đã được nghiên cứu, nhằm thay thế kháng sinh tác dụng ức chế vi khuẩn gây bệnh. Năm 2011, Mine và Boopathy đã sử dụng các axit hữu cơ: axit formic, axit axetic, axit propionic và axit butyric, để ức chế sinh trưởng của *Vibrio harveyi* trên tôm. Trong số bốn axit, axit formic có tác dụng ức chế mạnh nhất, sau đó là axit axetic, axit propionic và axit butyric. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của axit formic là 0,035% đã ngăn chặn sự phát triển của *Vibrio harveyi*. Cơ chế ức chế chính dường như là hiệu ứng pH của axit hữu cơ. Giá trị nồng độ hiệu dụng 50 (EC50) tại 96 giờ cấy cho tất cả các axit hữu cơ được xác định là 0,023, 0,041, 0,03 và 0,066% tương ứng với axit formic, axetic, propionic và butyric. Các kết quả nghiên cứu trong phòng thí nghiệm đang khuyến khích tạo ra thức ăn cho tôm với các axit hữu cơ để kiểm soát sự lây nhiễm vi khuẩn *Vibrio* trong các trang trại nuôi tôm.

Các axit hữu cơ và muối của chúng có tác dụng tăng trưởng tốt cho ĐVTS, tăng hiệu quả sử dụng thức ăn, giảm tỷ lệ chết ở một số giai đoạn của ĐVTS mang bệnh, ức chế các vi khuẩn gây bệnh từ đó giảm thiểu sự bùng phát dịch bệnh. Tuy nhiên, do có rất nhiều loài thủy sản khác nhau nên các axit hữu cơ thích ứng cho sự phát triển của các loài thủy sản khác nhau. Vì thế, khi bổ sung axit hữu cơ nào vào thức ăn thủy sản cần có những thí nghiệm khảo sát thận trọng về loại axit và liều lượng bổ sung đối với từng giai đoạn sinh lý cho mỗi loài cá khác nhau.

2.5. Vi sinh vật có lợi

Trong tự nhiên tồn tại rất nhiều nhóm vi sinh vật có lợi có thể ức chế sự sinh trưởng và phát triển của nhiều loài vi sinh vật gây bệnh. Nhóm vi sinh vật này thường được gọi là chế phẩm sinh học (probiotic) (Abdullah & Osman, 2010). Chế phẩm sinh học được

xem là liệu pháp thay thế hiệu quả và có thể ứng dụng rộng rãi để thay thế kháng sinh trong phòng trị bệnh trong nhiều lĩnh vực khác nhau bao gồm chăn nuôi, NTTS và sức khỏe con người.

Các loại vi sinh vật có lợi trong chế phẩm sinh học dùng cho NTTS gồm: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconos-toc*, *Enterococcus*, *Carnobacterium*, *Shewanella*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Pseu-domonas*, *Clostridium* và *Saccharomyces* spp. Các vi sinh vật có lợi đã được sử dụng để cải thiện hệ số thức ăn, tăng khả năng kháng bệnh và tỷ lệ sống trên các loài ĐVTS. El-Dakar và cộng sự (2007) đã chứng minh rằng chế phẩm sinh học thương mại có chứa *Bacillus subtilis* có thể giảm hệ số thức ăn và thúc đẩy sự phát triển của cá dĩa (*Siganus rivulatus*). Về khả năng kháng bệnh, Aly và cộng sự (2008) nhận thấy thức ăn bổ sung với 10^7 CFU/g của *Bacillus firmus*, *Bacillus pumilus* và *Citrobacter freundii* cải thiện đáng kể tỷ lệ sống sót cá rô phi (*Oreochromis niloticus*) khi gây nhiễm với vi khuẩn *Aeromonas hydrophila*. Vaseeharan & Ramasamy (2003) khi nghiên cứu bệnh đen mang xảy ra trên tôm sú đã thử nghiệm cho tôm sú tiếp xúc với *Bacillus subtilis* BT23 ở mật độ 10^6 - 10^8 cfu/ml trong 6 ngày trước khi cảm nhiễm với *Vibrio harveyi* ở 10^3 - 10^4 cfu/ml trong 1h. Kết quả điều trị bệnh đen mang bằng probiotic B *subtilis* BT23 trong thời gian dài hay ngắn đều cho thấy tỷ lệ chết giảm 90% (Vaseeharan & Ramasamy, 2003). Để tăng khả năng sống sót của ấu trùng tôm sú, Dương Nhật Linh và cộng sự (2012) đã phân lập được 6 chủng *Bacillus* (T9, F10, F2, F13, F22, F11) an toàn từ trùn quế, sau đó ấu trùng tôm được xử lý trước với các chủng *Bacillus* spp. mật độ 106 CFU/ml trong 6 giờ và gây nhiễm với *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*). Kết quả cho thấy 6 chủng (T9, F10, F2, F13, F22, F11) có khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú, có tỷ lệ sống cao hơn so với lô đối chứng chỉ gây nhiễm với *Vibrio* spp.

Khi được bổ sung vào môi trường nước, một số vi khuẩn có lợi hoạt động như tác

nhân xử lý sinh học bằng cách cải thiện chất lượng nước và điều kiện ao nuôi đồng thời giảm thiểu sự suy thoái môi trường. Các nhóm vi sinh vật thường được sử dụng trong mục đích này là probiotic (vi khuẩn lactic, bacillus), vi sinh vật ôxy hóa H_2S (vi khuẩn tía quang hợp kỵ khí), vi sinh vật tham gia vào các chu trình nitơ, phospho và phân giải các hợp chất hữu cơ (*Pseudomonas*, *Rhodococcus*, vi khuẩn khử nitrat, vi khuẩn tích lũy phospho) (Đình Thúy Hằng, 2007). Nhóm nghiên cứu của Phạm Văn Ty và cộng sự (2007) từ 130 chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học đã lựa chọn được 5 chủng vi khuẩn có lợi dùng trong nuôi tôm. Trong đó, hai chủng V20 (*B. licheniformis*) và V11 (*Bacillus subtilis*) có khả năng sinh enzyme ngoại bào phân giải nhanh các chất hữu cơ dư thừa. Ba chủng V75 (*B. subtilis*), L40 (*Lactobaccillus plantarum*) và L1.1 (*Enterococcus lactis*) có khả năng sinh các chất kháng khuẩn diệt nhiều loại vi khuẩn gây bệnh cho tôm. Kết quả cho thấy chế phẩm có khả năng làm sạch môi trường ao nuôi, các chỉ số BOD, COD, H_2S , NO_2 , NH_4 đều giảm, tỷ lệ động vật thủy sinh và tảo có lợi đều tăng, tỷ lệ tôm chết giảm, năng suất tăng 2 lần so với đối chứng.

Các chế phẩm vi sinh đã được sử dụng ngày càng rộng rãi để tăng cường khả năng miễn dịch của ĐVTS, nhất là trong ngành nuôi tôm công nghiệp. Năm 2010, Hai và Fotedar đã chỉ ra ba chủng vi khuẩn: *Bacillus*, *Lactobacillus* và *Pseudomonas*, thường được dùng làm men vi sinh trong nuôi tôm. Ở cá, năm 2007 Nayak và cộng sự đã sử dụng thức ăn có chứa 10^8 cfu/g *B. subtilis* thì thấy rằng khả năng miễn dịch của cá chép được cải thiện rất nhiều so với thức ăn không bổ sung vi sinh vật có lợi này. El-Rhman và cộng sự (2009) đã phát hiện việc bổ sung *Micrococcus luteus* vào thức ăn của cá rô phi sông Nile (*Oreochromis niloticus*) trong 90 ngày cải thiện chức năng miễn dịch và khả năng kháng bệnh của cá. Việc bổ sung chế phẩm sinh học có chứa các vi sinh vật có lợi vào thức ăn có hiệu quả hơn cho ĐVTS so với việc áp dụng trực tiếp vào hệ thống nuôi. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng khuyến cáo, nếu dùng quá liều hoặc sử dụng men vi sinh kéo dài có thể gây ức chế miễn dịch cho ĐVTS.

Bảng 1. Các nghiên cứu sử dụng fructooligosaccharides làm chất kích thích miễn dịch trong NTTS.

Đối tượng (Khối lượng)	Liều cho ăn	Thời gian thử nghiệm	Kết quả	Nguồn
Cá hồi Đại Tây Dương (<i>Salmo salar</i>) (200,2 ± 0,6 g)	1%	4 tháng	Không ảnh hưởng tới sản xuất bạch cầu trung tính trong máu. Hoạt động Lysozyme trong huyết thanh không thay đổi.	(Grisdale-Helland & cs., 2008)
Cá vền dài (<i>Megalobrama terminalis</i>) (30,5 ± 0,5g)	0,3; 0,6%	8 tuần	ACP, PO, ACH50, Ig M đều tăng	(Zhang & cs., 2013)
Cá chép (<i>Rutilus rutilus</i>) (0,67 ± 0,03g)	1; 2; 3%	7 tuần	Huyết thanh Ig, hoạt động Lysozyme, ACH50 đều tăng Khả năng chống chịu với độ mặn tăng cường	(Soleimani & cs., 2012)
Cá bon Nhật Bản (<i>Paralichthys olivaceus</i>) (21g)	0,005%	56 ngày	Tăng hoạt động Lysozyme Không tăng chỉ số hoạt động thực bào	(Ye & cs., 2011)
Tôm hùm đất (<i>Procambarus clarkii</i>) (15 ± 1g)	0,008; 0,01%	30 ngày	Các gen miễn dịch tăng (crustin1, lysozyme, SOD và proPO) Kích thích gia tăng hoạt động thực bào, SOD tăng, tăng khả năng kháng vi khuẩn <i>Aeromonas hydrophila</i>	(Dong & Wang, 2013)
Hải sâm (<i>Apostichopus japonicus</i>) (3,72 ± 0,16g)	0,25; 0,5%	8 tuần	Tăng 0.5% FOS TCC, Tăng quá trình thực bào, tăng PO Tăng cường khả năng chống lại <i>Vibrio splendidus</i>	(Zhang & cs., 2010)
Hải sâm (<i>Apostichopus japonicus</i>) (5,06 ± 0,1g)	0,4; 0,8; 1,6%	50 ngày	Không cải thiện được khả năng miễn dịch	(Sun & cs., 2012)
Cá tầm (<i>Acipenser stellatus</i>) (30,16 ± 0,14)	1; 2%	11 tuần	Tăng 1% FOS Tăng hoạt động Lysozyme trong huyết thanh	(Akrami & cs., 2013)
Cá đù vàng (<i>Larimichthys crocea</i>) (7,82 ± 0,68g)	0,2; 0,4%	10 tuần	Không tăng cường được khả năng miễn dịch bẩm sinh	(Ai & cs., 2011)

ACH50: alternative complement activity; ACP: plasma alkaline phosphatase; PO: phenoloxidase; SOD: superoxide dismutase; TCC: total coelomocyte count

2.6. Prebiotics

Prebiotics là chất xơ khó tiêu giúp tăng cường vi khuẩn có lợi cho đường ruột, từ đó cải thiện sức đề kháng của vật chủ (Roberfroid, 1993). Những tác động có lợi của prebiotics là do các sản phẩm phụ có nguồn gốc từ sự lên men của vi khuẩn đường

ruột. Một số nghiên cứu ứng dụng prebiotics có tác dụng tăng trưởng, tăng tính kháng bệnh, giảm tỷ lệ chết, kích thích miễn dịch (Anbazahan & cs., 2014). Các prebiotics bao gồm một số chất như: fructooligosaccharide, carotenoids, levamisol, thyroxine, inulin, lactoferrin,...

* Carotenoids

Carotenoids là tiền chất của Vitamin A, có tác dụng nâng cao sức đề kháng cho động vật (Krinsky, 1991). Carotenoids tinh khiết có thể tổng hợp được, tuy nhiên carotenoids tự nhiên có sẵn rất nhiều và rẻ hơn chất tinh khiết nên carotenoids tự nhiên được sử dụng nhiều làm phụ gia thức ăn (Wang & cs., 2017). Các hoạt động thực bào, bổ thể và lysozyme được tăng cường hoặc nâng cao để chống lại mầm bệnh đã được nghiên cứu ở một số loài cá và tôm sau khi sử dụng các chế độ ăn giàu carotenoid khác nhau (Yanar & cs., 2007). Anbazahan và cộng sự (2014) sử dụng chế độ cho ăn giàu carotenoids cho cá chép (*C. carpio*) đã kết luận chế độ ăn uống giàu chất carotenoids sẽ tăng cường tích cực tình trạng miễn dịch và bảo vệ cá chép khỏi nhiễm vi khuẩn *A. hydrophila*.

* Levamisole

Levamisole là một chất đồng phân levo của tetramisole, được sử dụng rộng rãi như một loại thuốc trị giun sán trong con người và các động vật khác, là một chất kích thích miễn dịch tiềm năng theo thời gian. Levamisole được biết đến với tác dụng kích thích, tác động lên các chức năng khác nhau của hệ thống miễn dịch. Nó đã được đánh giá có tác dụng kích thích miễn dịch, tăng sức kháng bệnh, tăng trưởng ở cá tráp (*Sparus aurata*), cá hồi vân (*Oncorhynchus mykiss*) và cá chép (*C. carpio*) (Gopalakannan & Arul, 2006).

* Thyroxine

Là một chất có vai trò quan trọng trong điều chỉnh sinh trưởng và dinh dưỡng ở cá. Thyroxine kích thích sự tổng hợp enzyme cần thiết cho sự trao đổi chất của tế bào. Power và cộng sự (2001) đã chỉ ra rằng thyroxine ở tuyến giáp đóng vai trò quan trọng trong quy định sự phát triển, tăng trưởng và tái sản xuất lượng máu ở cá. Năm 2015, Iromo cùng nhóm nghiên cứu đã công bố khi bổ sung hormone thyroxine liều thấp cho tôm, cua bố mẹ thì đẩy nhanh quá trình hình thành buồng trứng (Iromo & cs., 2015). Ngoài một số chất prebiotics trên, các chất Inulin, Lactoferrin, fructooligosaccharide (FOS)... cũng có tác dụng có lợi khi bổ sung vào thức ăn ĐVTS. Trong Bảng 1 trình bày

một số tác dụng của FOS khi bổ sung vào thức ăn của ĐVTS đã được nghiên cứu.

2.7. Chiết xuất thảo mộc

Chiết xuất thảo mộc cho thấy tiềm năng ứng dụng như chất kích thích miễn dịch trong NTTS bởi vì chúng có thể dễ dàng thu được và hoạt động kháng các tác nhân gây bệnh. Một số thảo dược hoặc sản phẩm phụ của chúng có chứa các hợp chất phenolic, polyphenolic, alkaloid, quinone, terpenoid, lectine, saponin, flavonoid và polypeptide, nhiều trong số đó là những chất thay thế hiệu quả cho kháng sinh, hóa chất, vắc xin, và các hợp chất tổng hợp khác (Harikrishnan & cs., 2011). Chúng có thể được sử dụng dưới dạng toàn bộ cây hoặc các bộ phận (lá, rễ hoặc hạt) hoặc hợp chất chiết xuất, thông qua nước thường xuyên hoặc phụ gia thức ăn, đơn lẻ hoặc kết hợp các hợp chất chiết xuất, hoặc thậm chí là hỗn hợp với prebiotic hoặc các chất kích thích miễn dịch khác (Zakeş & cs., 2008).

Chiết xuất rễ *Scutellaria* có hoạt tính kháng khuẩn và có hiệu quả chống lại nhiều loại vi khuẩn, chẳng hạn như *Streptococcus* spp., *Mycobacterium* spp. và *Pseudomonas* spp. (Tan & Vanitha 2004). Ardo đã thử nghiệm 2 loại chiết xuất *Astragalus membranaceus* và *Lonicera japonica* vào thức ăn cá rô phi sông Nile trong 4 tuần, sau đó được cảm nhiễm với *A. hydrophila*. Kết quả cho thấy cá rô phi ăn kết hợp hai loại thảo mộc hoặc kết hợp cùng với 0,05% boron đã tăng cường hoạt động thực bào, đồng thời làm giảm tỷ lệ chết ở cá rô phi sông Nile khi cảm nhiễm *A. hydrophila*.

Để đánh giá tiềm năng thúc đẩy tăng trưởng của ba loại thảo dược *Alteranthera sessilis*, *Eclipta alba* và *Cissus quadrangularis* lên ấu trùng tôm càng xanh *Macrobrachium rosenbergii* (PL). Radhakrishnan và cộng sự (2014) đã cho ấu trùng tôm càng xanh ăn các loại thức ăn kết hợp thảo mộc này trong 90 ngày. Kết quả cho thấy các thông số tăng trưởng (tỷ lệ sống, trọng lượng, tốc độ tăng trưởng và hàm lượng protein) cao hơn đáng kể ($P < 0,05$) ở lô thử nghiệm so với lô đối chứng. Trong đó chiết xuất *C. quadrangularis* kết hợp với thức ăn cho thấy khả năng giảm tỷ lệ chết, tốc độ tăng trưởng và nâng cao sản lượng là tốt nhất, tiếp

đền là *E. alba* và *A. sessilis*. Do đó, các loại thảo mộc này có thể được kết hợp trong các công thức thức ăn nhân tạo để nuôi tôm càng xanh phát triển bền vững. Các chiết xuất thảo dược ngoài khả năng kích thích tăng trưởng, chúng còn có khả năng tăng cường khả năng miễn dịch ở tôm với virus bệnh đầu vàng (YHV) và bệnh đốm trắng (WSSV) với một số thảo dược như *Eclipta alba*, *Aegle marmelos*, *Tinospora cordifolia*, *Picrorhiza kurooa* và *Cyanodon dactylon* (Citarasu & cs., 2003; Citarasu, 2010). Bindhu và cộng sự (2014) đã chỉ ra năm loại thảo mộc khác gồm *Adathoda vasica*, *Agathi grandiflora*, *Leucas aspera*, *Psoralea corylifolia* và *Quercus infectoria* có tác dụng kháng virút và kích thích miễn dịch chống lại WSSV trên tôm thẻ chân trắng Ấn Độ (*Fenneropenaeus indicus*).

Tại Việt Nam, nhiều loài thảo dược đã được ứng dụng trong NTTS ở cả phương diện trong ống nghiệm và kinh nghiệm của các hộ nuôi lâu năm. Một số thảo dược được sử dụng như: cây ôi, diệp hạ châu, cỏ mực, cây thầu dầu, cây bàng, cây sim và tỏi... Chúng có khả năng kháng khuẩn, diệt nấm, hay như một chất kháng sinh tự nhiên. Nghiên cứu của Hồng Mộng Huyền và cộng sự (2018) khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của 7 loại chất chiết thảo dược (thầu dầu, lưỡi rắn, mật gấu, chùm ngây, lược vàng, ô rô và sài đất trên hai chủng vi khuẩn thường gây bệnh cho tôm nuôi *Vibrio harveyi* và *Vibrio parahaemolyticus*. Kết quả thí nghiệm cho thấy bảy loại cao chiết có hoạt tính kháng khuẩn khác nhau, trong đó cao chiết thầu dầu (*Ricinus communis L.*) cho hiệu quả cao nhất với đường kính vòng vô khuẩn 17-18 mm, kế đến là cao chiết mật gấu (*Vernonia amygdalina del.*), chùm ngây (*Moringa oleifera*), ô rô (*Acanthus ilicifolius L.*) và sài đất (*Wedelia calendulacea (L) Less.*) với đường kính vòng vô khuẩn ở mức trung bình từ 10-11 mm. Bên cạnh đó, cây sim, cây tỏi có tác dụng như một loại kháng sinh tự nhiên đã được Đặng Thị Lụa và cộng sự (2015) công bố ở cây sim với tác dụng diệt khuẩn của cao chiết lá sim và hạt sim (*Rhodymyrtus tomentosa*) đã được xác định đối với vi khuẩn gây bệnh hoại tử gan tụy cấp tính trên tôm thẻ chân trắng với kết quả đường kính vòng vô khuẩn đạt được là 17,67 mm đối với chủng *V. parahaemolyticus*

KC13.14.2, 18 mm với chủng *V. parahaemolyticus* KC12.02.0 và 19,3 mm với chủng *Vibrio sp.* KC13.17.5. Trên cây tỏi đã có nhiều nghiên cứu của Trần Thị Phương Dung và cộng sự (2022), Nguyễn Thị Hạnh và cộng sự (2021), Nguyễn Thị Hạnh & Đặng Thị Lụa (2016) cho thấy tác dụng phòng và trị một số bệnh như đường ruột, phân trắng, đốm trắng, gan, tụy... trên tôm, cá.

Tương tự như các chất kích thích miễn dịch khác, chiết xuất thảo dược có thể được áp dụng qua đường tiêm (Harikrishnan & cs., 2011), tắm/ngâm (Çek & cs., 2007) hoặc kết hợp thức ăn (Harikrishnan & cs., 2011). Trong ba phương thức trên thì cho ăn thường cho tác dụng tốt nhất và tiết kiệm chi phí (Yin & cs., 2006). Hiện nay, chiết xuất thảo dược thường được sử dụng làm phụ gia thức ăn trong NTTS (Wang & cs., 2015). Tuy nhiên, cần có các nghiên cứu sâu hơn về tính ổn định của nguyên liệu thảo dược trong môi trường nước và khả năng tiêu hóa của cá đối với các loại thảo dược này. Đồng thời, cần có các thí nghiệm xác định độc tính trong phương pháp ống nghiệm để xác định tính an toàn trước khi áp dụng các loại thảo mộc vào NTTS (Bulfon & cs., 2015).

3. YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG TỚI CHẤT KÍCH THÍCH MIỄN DỊCH

3.1. Thời gian sử dụng chất kích thích miễn dịch

Chất kích thích miễn dịch có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với vắc-xin (Wei & cs., 2020), tuy nhiên, nếu sử dụng kết hợp vắc-xin cần tính toán thời gian phù hợp để tiêm đảm bảo vắc-xin đáp ứng miễn dịch bảo vệ. Trong một số trường hợp, chất kích thích miễn dịch được dùng tốt nhất để phòng bệnh cho cá, dùng cho ăn hoặc ngâm, tiêm trước khi đến giai đoạn ĐVTS tiếp xúc với mầm bệnh (phòng dịch bệnh theo mùa). Tuy nhiên liều lượng và thời gian cho mỗi phương thức sử dụng cần được xác định một cách chắc chắn và phù hợp (Wang & cs., 2017).

3.2. Liều lượng sử dụng chất kích thích miễn dịch

Liều lượng ảnh hưởng vô cùng quan trọng đến tác dụng của miễn dịch theo thời gian, tương ứng với đó là mỗi loài có liều lượng phù hợp với từng chất kích thích miễn dịch,

liều cao hay quá thấp sẽ tạo nên các phản ứng miễn dịch khác nhau. Nguyễn Ngọc Duy và cộng sự (2013) tìm ra liều lượng β -glucan thích hợp để tăng khả năng sống sót của cá rô phi chống lại vi khuẩn *S. agalactiae* là 100-150 mg/kg thức ăn, với liều lượng thấp hơn không cho thấy khả năng kháng bệnh. Nghiên cứu của Ortuno và cộng sự (2000) cho thấy rằng liều lượng Vitamin E thích hợp cho cá chêm (*Sparus aurata*) khi bổ sung vào thức ăn là 1200 mg/kg, nếu nồng độ Vitamin thấp hơn (<600 mg/kg) hoặc cao hơn (>1800 mg/kg) có thể tạo ra các kiểu kích thích miễn dịch khác nhau. Alvarez-Pellitero và cộng sự (2006) đã xác định được lượng bổ sung thích hợp levamisole trong khẩu phần ăn của cá nhỏ hơn 500 mg/kg, cho thấy mức tăng trưởng tốt, nếu lượng bổ sung levamisole tới 1000 mg/kg cho thấy hiệu quả sử dụng thức ăn của cá giảm, đồng thời cá có dấu hiệu tăng trưởng chậm. Do vậy, liều lượng sử dụng chất kích thích miễn dịch có thể ảnh hưởng đến hiệu quả và hiệu lực mà còn ảnh hưởng đến giá thành sản phẩm của các chất kích thích miễn dịch khi cung cấp ra thị trường.

3.3. Phương thức sử dụng

Các chất kích thích miễn dịch được sử dụng với các phương thức như ngâm, tiêm, cho ăn hay làm chất bổ trợ, kết hợp. Phương pháp tiêm chỉ áp dụng cho cá thể với kích thước lớn hơn 15g, tuy nhiên đây là phương pháp mất nhiều thời gian và công sức. Phương pháp ngâm tạo ra phản ứng miễn dịch không đặc hiệu hơn, nhưng tiết kiệm chi phí hơn so với tiêm, nhưng gây căng thẳng cho cá khi xử lý, áp dụng trong hệ thống nuôi thâm canh. Phương pháp ngâm rất hiệu quả trong quá trình cá con thích nghi với ao nuôi trong điều kiện đồng ruộng. Cho ăn là phương pháp hiệu quả nhất về mặt kinh tế. Nó chủ yếu phù hợp với hệ thống nuôi quảng canh. Bột chất kích thích miễn dịch được trộn với thức ăn bằng cách sử dụng lớp phủ dầu cá. Mỗi chất kích thích miễn dịch có cơ chế tác dụng khác nhau lên ĐVTS theo các con đường khác nhau, có thể trực tiếp tác động lên môi trường sống hay đi thẳng vào cơ thể. Một số vi sinh vật có lợi có thể đưa trực tiếp vào môi trường nước (Đình Thúc Hằng, 2007), Vitamin, β -glucan, Chitosan,

axit hữu cơ được sử dụng bổ sung vào thức ăn (Amphan & cs., 2019; Mari & cs., 2014; Situmorang, 2015) hay làm chất bổ trợ vắc-xin (Wei & cs., 2020). β -1,3-glucan được trích ly từ tảo đỏ *Gelidium amansii* thực hiện ba phương pháp ngâm, tiêm và cho ăn. Kết quả thí nghiệm cho thấy các chỉ tiêu miễn dịch gia tăng có ý nghĩa khi tôm được ngâm trong nước biển 34‰ có chứa hỗn hợp ly trích từ tảo *G. amansii* ở nồng độ 400 - 600 mg/l sau 1 giờ. Đối với thí nghiệm tiêm, liều lượng 6 μ g/ g tôm được cho là hiệu quả nhất sau 1 ngày tiêm, và khi tôm được cho ăn ở liều lượng 1-2 g/ kg thức ăn sẽ có tác dụng tăng cường miễn dịch sau 14 ngày (Fu & cs., 2007). Do vậy, lựa chọn phương thức phù hợp để đưa các chất kích thích miễn dịch vào ĐVTS vô cùng quan trọng, nếu lựa chọn đúng có tác dụng vô cùng hiệu quả, lựa chọn phương thức không phù hợp có thể gây ra các kích thích miễn dịch khác nhau, hoặc không có tác dụng, gây thiệt hại về kinh tế và ô nhiễm môi trường nuôi.

4. KẾT LUẬN

Với những phân tích tổng hợp được đưa ra ở trên, có thể thấy rằng các chất kích thích miễn dịch thường được dùng trong thức ăn thủy sản như: β -glucan, Chitosan, Vitamin, axit hữu cơ và muối của chúng, các vi sinh vật có lợi đã chứng minh được tăng kích thích miễn dịch cho ĐVTS như: tăng sinh trưởng, tăng sức đề kháng, chống lại sự lây nhiễm bệnh, giảm tỷ lệ chết...

Có ba cách chủ yếu để cung cấp chất kích thích miễn dịch bao gồm tiêm, ngâm và cho ăn. Tuy nhiên, khi sử dụng các chất kích thích miễn dịch cần chú ý tới liều lượng hợp lý, cũng như thời gian, phương thức sử dụng chúng như cho ăn, tắm, kết hợp với các loại thuốc khác và ở các loài ĐVTS là khác nhau. Đồng thời cần có các nghiên cứu thêm phương thức hoạt động các chất kích thích miễn dịch kết hợp với các nhóm khác như vắc-xin, các chất bổ trợ khác để đạt được hiệu quả tốt nhất khi sử dụng. Từ đó góp phần phòng chống dịch bệnh hiệu quả và hạn chế tình trạng sử dụng kháng sinh đang gây ra nhiều hệ lụy như kháng kháng sinh và tồn dư kháng sinh trong các sản phẩm thủy sản như hiện nay.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abdel-Razek, N. (2019). Antimicrobial activities of chitosan nanoparticles against pathogenic microorganisms in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture International*, 27(5), 1315-1330.
- Abdullah, S., A. & Osman, M., M. (2010). Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw cow milk, white cheese and Rob in Sudan. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9(12), 1203-1206.
- Alishahi, A., Mirvaghefi, A., Tehrani, M., R., Farahmand, H., Koshio, S., Dorkoosh, F., A. & Elsabee, M., Z. (2011). Chitosan nanoparticle to carry Vitamin C through the gastrointestinal tract and induce the non-specific immunity system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Carbohydrate polymers*, 86(1), 142-146.
- Amlashi, A., S., Falahatkar, B., Sattari, M. & Gilani, M., T. (2011). Effect of dietary Vitamin E on growth, muscle composition, hematological and immunological parameters of sub-yearling beluga *Huso huso* L. *Fish & Shellfish Immunology*, 30(3), 807-814.
- Amphan, S., Unajak, S., Printrakoon, C. & Areechon, N. (2019). Feeding-regimen of β -glucan to enhance innate immunity and disease resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* Linn., against *Aeromonas hydrophila* and *Flavobacterium columnare*. *Fish & Shellfish Immunology*, 87, 120-128.
- Anbazahan, S., M., Mari, L., S., S., Yogeshwari, G., Jagruthi, C., Thirumurugan, R., Arockiaraj, J., Velanganni, A., A., J., Krishnamoorthy, P., Balasundaram, C. & Harikrishnan, R. (2014). Immune response and disease resistance of carotenoids supplementation diet in *Cyprinus carpio* against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(1), 9-13.
- Bai, N., Zhang, W., Mai, K., Wang, X., Xu, W. & Ma, H. (2010). Effects of discontinuous administration of β -glucan and glycyrrhizin on the growth and immunity of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture*, 306(1-4), 218-224.
- Bindhu, F., Velmurugan, S., Donio, M., B., S., Michaelbabu, M., & Citarasu, T. (2014). Influence of *Agathi grandiflora* active principles inhibit viral multiplication and stimulate immune system in Indian white shrimp *Fenneropenaeus indicus* against white spot syndrome virus infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 482-492.
- Bùi Thị Bích Hằng & Nguyễn Hoàng Vũ. (2019). Ảnh hưởng của thức ăn có bổ sung chitosan lên một số chỉ tiêu miễn dịch không đặc hiệu ở cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 33-41.
- Bùi Thị Bích Hằng, Phạm Văn Thi & Nguyễn Minh Tân. (2015). Ảnh hưởng của Vitamin C lên một số yếu tố miễn dịch không đặc hiệu và khả năng kháng vi khuẩn gây bệnh của cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ*, 85-91.
- Chieng, C., C., Y., Daud, H., M., Yusoff, F., M. & Abdullah, M. (2018). Immunity, feed, and husbandry in fish health management of cultured *Epinephelus fuscoguttatus* with reference to *Epinephelus coioides*. *Aquaculture and fisheries*, 3(2), 51-61.
- Dawood, M., A. & Koshio, S. (2018). Vitamin C supplementation to optimize growth, health and stress resistance in aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 10(2), 334-350.
- Diệp Tuấn Em. (2012). Ảnh hưởng của β -glucan lên tăng trưởng và tỷ lệ sống của cá rô đầu vuông (*Anabas sp*). Khóa luận tốt nghiệp, Khoa Sinh học ứng dụng – Trường Đại học Tây Đô.
- Dos Santos Voloski, A., P., de Figueiredo Soveral, L., Dazzi, C., C., Sutili, F., Frandoloso, R. & Kreutz, L., C. (2019). β -Glucan improves wound healing in silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Fish & Shellfish Immunology*, 93, 575-579.
- Dương Nhật Linh, Nguyễn Văn Minh, Đỗ Bảo Ngọc & Đan Duy Pháp. (2012). Nghiên cứu tính an toàn và khả năng bảo vệ ấu trùng tôm sú của một số chủng *Bacillus* phân lập từ trùn quế trong điều kiện phòng thí nghiệm. *Tạp chí Kỹ Thuật và Công Nghệ*, 7(1), 52-59.

- Đinh Thúy Hằng. (2007). *Nghiên cứu quy trình sản xuất chế phẩm vi sinh dùng trong nuôi trồng thủy sản và làm sạch môi trường*. Báo cáo đề tài nghiên cứu khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội.
- Elala, N., M., A. & Ragaa, N., M. (2015). Eubiotic effect of a dietary acidifier (potassium diformate) on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*. *Journal of Advanced Research*, 6(4), 621-629.
- Fu, Y., W., Hou, W., Y., Yeh, S., T., Li, C., H. & Chen, J., C. (2007). The immunostimulatory effects of hot-water extract of *Gelidium amansii* via immersion, injection and dietary administrations on white shrimp *Litopenaeus vannamei* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 22(6), 673-685.
- Harikrishnan, R., Balasundaram, C. & Heo, M., S. (2011). Review: Impact of plant products on innate and adaptive immune system of cultured finfish and shellfish. *Aquaculture*, (317), 1-15.
- Huỳnh Trường Giang, Vũ Ngọc Út & Trương Quốc Phú. (2011). Sử dụng chiết suất β -glucan từ rong biển để tăng sức đề kháng của tôm biển. *Tổng quan Kỹ yếu Hội nghị Khoa học thủy sản lần 4, Trường Đại học Cần Thơ* (103-113).
- Iromo, H., Zairin, J., M., Agus, S., M. & Manalu, W. (2015). The optimum dose of thyroxine hormone supplementation in broodstock mud crab (*Scylla serrata*) to accelerate ovarian maturation. *Journal of Aquaculture Research and Development*, 6(3), 317.
- Kim Văn Vạn, Lê Việt Dũng & Trương Đình Hoài. (2021). Ảnh hưởng của beta-glucan và một số chất bổ sung lên sinh trưởng, tỷ lệ sống và sức đề kháng bệnh do vi khuẩn *Flavobacterium columnarae* trên cá rô phi giống (*Oreochromis niloticus*). *Tạp chí Khoa học kỹ thuật Thú y*, 28(2), 45-51.
- Li, P., Wen, Q. & Gatlin, D., M. (2009). Dose-dependent influences of dietary β -1, 3-glucan on innate immunity and disease resistance of hybrid striped bass *Morone chrysops* \times *Morone saxatilis*. *Aquaculture Research*, 40(14), 1578-1584.
- Lim, C., Lückstädt, C., Webster, C., D. & Kesius, P. (2015). Organic acids and their salts. In Cheng-Sheng Lee, *Dietary nutrients, additives, and fish health* (305-320). Hoboken, NJ, USA: Willey-Blackwell.
- Lin, S., Mao, S., Guan, Y., Luo, L. & Pan, Y. (2012). Effects of dietary chitosan oligosaccharides and *Bacillus coagulans* on the growth, innate immunity and resistance of koi (*Cyprinus carpio koi*). *Aquaculture*, 342, 36-41.
- Mai, N., T., Mandiki, S., N., Thu, T., T., N., Larondelle, Y., Mellery, J., Mignolet, E., Cornet, V., Flamion, E. & Kestemont, P. (2019). Growth performance and immune status in common carp *Cyprinus carpio* as affected by plant oil-based diets complemented with β -glucan. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 288-299.
- Mari, L., S., S., Jagruthi, C., Anbazahan, S., M., Yogeshwari, G., Thirumurugan, R., Arockiaraj, J., Mariappan, P., Balasundaram, C. & Harikrishnan, R. (2014). Protective effect of chitin and chitosan enriched diets on immunity and disease resistance in *Cirrhina mrigala* against *Aphanomyces invadans*. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(2), 378-385.
- Mine, S. & Boopathy, R. (2011). Effect of organic acids on shrimp pathogen, *Vibrio harveyi*. *Current microbiology*, 63(1), 1-7.
- Nguyễn Thị Hạnh & Đặng Thị Lua. (2016). Đánh giá khả năng diệt khuẩn của dịch chiết tỏi (*Allium sativum* L.) đối với một số vi khuẩn gây bệnh trên cá nuôi nước ngọt. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn*, (22), 100-104.
- Nguyễn Thị Hạnh, Phan Thị Vân, Phạm Thị Yên, Lê Thị Mây & Trương Thị Mỹ Hạnh. (2021). Khả năng kháng khuẩn và phòng bệnh hoại tử gan tụy cấp ở tôm thẻ chân trắng (*Penaeus vannamei*) của tỏi (*Allium sativum*) lên men. *Bản B của Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 63(2), 49-54.
- Nguyễn Thị Kim Nguyệt. (2012). *Ảnh hưởng của β -glucan lên tăng trưởng và tỷ lệ sống cá Lóc bông (*Channa micropeltes*) giai đoạn từ hương lên giống*. Khóa luận tốt nghiệp, Khoa Sinh học ứng dụng – Trường Đại học Tây Đô.
- Nguyễn Ngọc Duy, Nguyễn Quốc Hiến & Đặng Văn Phú. (2013). Nghiên cứu hiệu ứng kích kháng bệnh của β -glucan cắt

- mạch bằng phương pháp chiếu xạ đối với cá rô phi. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ*, 51(6), 737-745.
- Orzali, L., Corsi, B., Forni, C. & Riccioni, L. (2017). Chitosan in agriculture: a new challenge for managing plant disease. *Biological activities and application of marine polysaccharides*, 17-36.
- Phạm Văn Ty, Nguyễn Lâm Dũng, Nguyễn Thanh Dương, Bùi Việt Hà, Đào Thị Lương, Trần Thị Thanh Huyền, Nguyễn Duy Thịnh, Phạm Đức Ngọc & Nguyễn Thị Thúy Hằng, (2007). *Tìm kiếm các chủng vi sinh vật có hoạt tính sinh học nhằm tạo chế phẩm làm sạch nước nuôi tôm*. Đề tài NCKH QG-TĐ. 05.05.
- Pionnier, N., Falco, A., Miest, J., J., Shrive, A., K. & Hoole, D. (2014). Feeding common carp *Cyprinus carpio* with β -glucan supplemented diet stimulates C-reactive protein and complement immune acute phase responses following PAMPs injection. *Fish & Shellfish Immunology*, 39(2), 285-295.
- Qiang, J., Wasipe, A., He, J., Tao, Y., F., Xu, P., Bao, J., W., Chen, D., J. & Zhu, J., H. (2019). Dietary Vitamin E deficiency inhibits fat metabolism, antioxidant capacity, and immune regulation of inflammatory response in genetically improved farmed tilapia (GIFT, *Oreochromis niloticus*) fingerlings following *Streptococcus iniae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*, 92, 395-404.
- Quesada, S., P., Paschoal, J., A., R. & Reyes, F., G., R. (2013). Considerations on the aquaculture development and on the use of veterinary drugs: special issue for fluoroquinolones-a review. *Journal of food science*, 78(9), R1321-R1333.
- Ranjan, R., Prasad, K., P., Vani, T. & Kumar, R. (2014). Effect of dietary chitosan on haematology, innate immunity and disease resistance of Asian seabass *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture Research*. 45(6), 983-993.
- Rashidian, G. (2019). *Application of polysaccharides in aquaculture: immunomodulatory effects and future perspectives*. Department of Aquaculture, Faculty of Faculty of Marine Sciences, University of Tarbiat Modares, Nor.
- Siriappagouder, P., Shankar, K., Kumar, B., N., Patil, R. & Byadgi, O., V. (2014). Evaluation of biofilm of *Aeromonas hydrophila* for oral vaccination of *Channa striatus*. *Fish & Shellfish Immunology*, 41(2), 581-585.
- Situmorang, M., L. (2015). *Application of poly- β -hydroxybutyrate in growth and health promotion of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* culture*. Ghent University.
- Stier, H., Ebbeskotte, V. & Gruenwald, J. (2014). Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1, 3/1, 6-D-glucan. *Nutrition journal*, 13(1), 1-9.
- Trần Thị Phương Dung, Lưu Tăng Phúc Khang, Huỳnh Thị Trúc Quân & Nguyễn Thị Trúc Quyên. (2022). Khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của dịch chiết tỏi (*Allium sativum*) và kinh giới (*Elsholtzia ciliata*) lên vi khuẩn *Edwardsiella ictaluri* gây bệnh trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Tạp chí Khoa học Trường Đại học sư phạm Tp Hồ Chí Minh*, 19(9), 1472-1484.
- Tổng cục Thủy sản. (2022). *Báo cáo sơ kết Hội nghị phòng, chống dịch bệnh động vật thủy sản năm 2022*. Hà Nội, 7/2022.
- Wang, S., H. & Chen, J., C. (2005). The protective effect of chitin and chitosan against *Vibrio alginolyticus* in white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 19(3), 191-204.
- Wang, W., Sun, J., Liu, C. & Xue, Z. (2017). Application of immunostimulants in aquaculture: current knowledge and future perspectives. *Aquaculture Research*, 48(1), 1-23.
- Wei, G., Tan, H., Ma, S., Sun, G., Zhang, Y., Wu, Y., Cai, S., Huang, Y. & Jian, J. (2020). Protective effects of β -glucan as adjuvant combined inactivated *Vibrio harveyi* vaccine in pearl gentian grouper. *Fish & Shellfish Immunology*, 106, 1025-1030.
- Wing-Keong, Ng. & Chik-Boon, K. (2017). The utilization and mode of action of organic acids in the feeds of cultured aquatic animals. *Reviews in Aquaculture*, 9(4), 342-368.